



Potencial terapêutico de nanopartículas de óxido de ferro

Romeu Ponte Dinis

Trabalho realizado sob orientação de:

Professor Doutor João Paulo Gil Lourenço

Monografia Para Obtenção Do Grau De Mestre

2019



Potencial terapêutico de nanopartículas de óxido de ferro

Romeu Ponte Dinis

Trabalho realizado sob orientação de:

João Paulo Gil Lourenço

Monografia Para Obtenção Do Grau De Mestre

2019

Potencial terapêutico de nanopartículas de óxido de ferro

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Universidade do Algarve, 29 de setembro de 2019

© 2019 Romeu Ponte Dinis

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho, através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Quero agradecer aos meus pais por tornarem possível a aventura que é a universidade, durante todas as dificuldades que se sentiram. Agradecer a sua enorme força e apoio que me transmitiram ao longo dos cinco anos em que estive afastado deles, uma vez que a insularidade não permitia as regulares visitas praticadas pelos demais colegas.

Quero deixar o meu agradecimento à minha namorada que esteve a meu lado desde o dia um do meu percurso académico, mantendo-se como porto seguro durante os tempos mais fáceis, assim como nos mais difíceis. É também com grande orgulho que vejo esta pessoa tornar-se uma colega de profissão e mais uma vez agradeço por todas as vezes em que a vontade de desistir sobressaltava e ela me indicava o caminho certo novamente.

Quero deixar o meu agradecimento à minha avó materna por ter sido fulcral nos meus anos formativos e me ter ajudado, de uma forma ou de outra, a tornar na pessoa que sou hoje. Com pouca escolaridade, percebeu que era de grande importância manter-me no caminho certo e muitas vezes, sem perceber, corrigiu erros meus, correções que ainda hoje tenho muito presentes em mente.

Deixo o meu agradecimento aos meus avós paternos por acreditarem sempre em mim e por terem sempre uma palavra carinhosa para dar. Estou certo de que a paciência demonstrada pelo meu avô e a devoção oferecida pela minha avó me moldaram para conseguir criar empatia com os utentes com quem trabalharei na minha profissão.

Gostaria de agradecer ao meu orientador por ter tido consideração pelas dificuldades que senti ao longo do desenvolvimento desta monografia e ter-se mantido a meu lado sempre com muita vontade e disponibilidade.

Quero agradecer também ao meu melhor amigo de infância e primo por todas as vezes que se mostrou disponível para ouvir os meus desabafos que, de alguma forma, me mantiveram no caminho certo.

Por último, mas não menos importante, agradecer ao meu melhor amigo, amizade feita já em solo académico, por todas as tardes passadas a estudar, as partilhas de ideias, as discussões sem nexos e também pela companhia nos tempos mais difíceis, uma amizade de contrato sem término, estou certo.

Resumo

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro têm mostrado nos últimos anos elevado potencial para aplicações em medicina. Dependendo das suas características intrínsecas e das modificações pós-síntese a que podem ser submetidas, podem ser usadas em diagnóstico, terapêutica ou em abordagens combinadas.

Na presente monografia, é feita uma revisão sobre as características e potenciais aplicações médicas das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com maior incidência em aplicações terapêuticas. Os temas revistos incluem a síntese das nanopartículas, as técnicas de caracterização mais utilizadas, as propriedades magnéticas e as aplicações terapêuticas, que incluem o melhoramento da imagiologia e radioterapia, a utilização de campos magnéticos para alcançar a hipertermia num local restrito do organismo e a entrega de fármacos direcionada.

São descritos os métodos de síntese mais comuns e que permitem a obtenção de nanopartículas com características diferenciadas, o que é um factor importante em posteriores aplicações. São abordadas diversas propriedades, como o magnetismo e o tamanho de partícula, que são fundamentais ou têm muita influência no seu desempenho. Finalmente são descritos diversos exemplos de aplicações terapêuticas que evidenciam a versatilidade destes materiais, que quando incorporados sistemas adequados permitem não só a técnica de hipertermia, mas também aumentar a eficácia da entrega direcionada de fármacos.

Termos chave: nanopartículas, magnéticas, óxido de ferro, hipertermia, entrega direcionada

Abstract

The iron oxide nanoparticles have shown in the last years an enormous potencial in medical applications. Depending on their intrinsic characteristics and modifications to which they can undergo after being synthesized, these particles can be used in diagnostics, therapeutics or in a combined approach.

In this work, we make a revision about characteristics and potencial medical applications of the magnetic iron oxide nanoparticles, paying special attention to their therapeutic applications. The revised themes include the synthesis of the nanoparticles, the more common characterization techniques, the magnetic properties and the therapeutic applications, which include the radiotherapy and imageology enhancement, the application of magnetic fields to achieve hyperthermia in a restrict local of the organism and the drug delivery.

The more common synthesis methods are described with emphasis on those which allow the obtaining of nanoparticles with differentiated characteristics, which is an important factor in further applications. Different properties were addressed, like magnetism and particle size, which are fundamental or have a major influence on its performance.

Finally, examples of therapeutic applications are given along this paper that show the versatility of these materials. These materials when incorporated in adequate systems, allow not only the hyperthermia technique but also the increase of the efficiency of drug delivery.

Keywords: nanoparticles, iron oxide, hyperthermia, drug delivery.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo.....	iii
Abstract	iv
Índice de equações	vi
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas	viii
Índice de Abreviaturas	ix
1. Introdução.....	1
2. Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de ferro	4
2.1. Métodos de síntese.....	4
2.1.1. Co-precipitação.....	4
2.1.2. Métodos de Elevada temperatura.....	6
2.1.3. Métodos de emulsões de óleo-água	8
2.1.4. Método Sol-gel	9
2.1.5. Método Poliol	11
2.1.6. Outros Métodos	11
2.2. Estabilização e modificação da superfície	14
2.4. Caracterização	17
3. Aplicações Terapêuticas	21
3.1. Hipertermia	21
3.1.1. Magnetismo	21
3.1.2. Aumento da temperatura <i>in situ</i>	24
3.2. Outras aplicações em terapêutica tumoral.....	29
3.2.1. Imagiologia.....	29
3.2.2. Melhoria da Radioterapia	31
3.2.3. Entrega de fármacos.....	35
3.3. Efeito das dimensões das nanopartículas	43
4. Conclusão	47
Referências	49

Índice de equações

Equação 1	4
Equação 2	26
Equação 3	32
Equação 4	32

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Diferentes estratégias para a funcionalização das nanopartículas de óxido de ferro (10).	15
Figura 2.2 - Fichas da base de dados ICDD PDF2 maghemite (verde), hematite (azul) e magnetite (vermelho).	17
Figura 2.3 - Os vários processos de backscattering para o ^{57}Fe após a ressonância da absorção de um incidente g-quantum.	19
Figura 3.1 - Regimes magnéticos de magnetite e maghemite em função do seu tamanho (superparamagnético, domínio singular e multidomínio).(86).....	22
Figura 3.2 - Ilustração esquemática da relação entre a coercividade e o raio das nanopartículas (86).	23
Figura 3.3 - Curvas de sobrevivência de células de ovário de hamster Chinês, aquecidas a diferentes temperaturas para diferentes intervalos de tempo. Adaptado de Dewey et al. (1997).....	25
Figura 3.4 - Esquema do princípio teórico do direcionamento de fármacos (138).	35
Figura 3.5 - Representação esquemática do método de direção-magnética de fármaco. As nanopartículas extravasam dos poros de uma parede de um vaso sanguíneo de tumor. (i.e. efeito de aumento da permeabilidade e retenção (EPR)) (144).....	37
Figura 3.6 - Dispositivo experimental para determinar o efeito de um campo magnético externo na biodistribuição de nanopartículas magnéticas após injeção intravenosa no rato, no qual o foco inflamatório havia sido induzido nas costas (139).....	38
Figura 3.7 - Esquema dos passos de síntese do nanocomposto magnético baseado em ciclodextrina - poliuretano	40
Figura 3.8 - Sequência de passos da preparação de microesferas ocas de magnetite de direcionamento tumoral como transportadores de fármacos anticancerígenos (149).	42
Figura 3.9 - Representação esquemática dos regimes magnéticos teóricos para a magnetite e maghemite, de acordo com algumas aplicações mais relevantes em função do tamanho de partícula.....	44

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Comparação das características das nanopartículas de acordo com o método de síntese utilizado (39).	13
Tabela 2.2 - Proteínas/Ligandos direcionadores selecionados que podem ser usados para a derivatização de nanopartículas magnéticas para diversas aplicações biomédicas (39).....	16

Índice de Abreviaturas

AMF – Campo Magnético Alternante

APCs – Células Apresentadoras de Antígenos

ATF – Fragmento Terminal de Aminoácido

CD – Ciclodextrina

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio

DBAB – Brometo de Dodeciltrimetilamônio

DLS – Dispersão Dinâmica de Luz

DOX – Doxorrubicina

DSC – Calorimetria Diferencial

FTIR – Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

HSPs – Proteínas de Choque Térmico

IONP – Nanopartícula de Óxido de Ferro

IV – Infravermelho

M-PLL – Poli-L-lisina

mV - miliVolts

NaDBS – Dodecilbenenosulfonato

NIRF – Fluorescência perto do Infravermelho

NK – *Natural Killer*

nm - Nanómetros

NPC – Complexo Poroso Nuclear

NP – Nanopartícula

NPOFs – Nano Partículas de Óxido de Ferro

PU – Poliuretano

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SDS – Dodecilsulfato de Sódio

SPMNP – Nanopartículas Superparamagnéticas

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

TG – Termogravimétrica

uPAR – Recetor Ativador do Plasminogénio tipo Urocinase

XRD – Difração de Raios-X

1. Introdução

A ciência à escala nanométrica tem vindo a receber especial atenção nos últimos anos pelas potencialidades que apresenta. A sua aplicabilidade pode compreender um vasto grupo de ciências, desde a tecnológica até à médica, sendo nesta última que nos iremos focar ao longo desta monografia.

Neste contexto, as nanopartículas (de diferentes materiais), com tamanho inferior ao das células do corpo humano, têm mostrado elevadas potencialidades em diversas áreas que incluem a entrega de fármacos, a formulação de agentes terapêuticos e a formulação de agentes de contraste em imagiologia. As nanopartículas de óxido de ferro encontram-se entre as mais estudadas devido às suas propriedades únicas que lhes conferem uma elevada potencialidade de aplicação na área da medicina.

Dentro da família de nanopartículas de óxido de ferro (NPOFs) é possível fazer uma distinção de acordo quer com a sua composição, quer com a sua conformação cristalina e até com o seu tipo de magnetismo, sendo que nesta monografia será dada relevância a três estruturas diferentes: hematite (α -Fe₂O₃), a magnetite (Fe₃O₄) e a magnemite (γ -Fe₂O₃). A magnetite é o mais estável dos óxidos de ferro podendo ser descrito em termos estruturais como uma rede hexagonal compacta de O em que os iões Fe(III) ocupam 2/3 dos interstícios octaédricos. Já a magnetite apresenta uma estrutura cúbica compacta de iões óxido em que todos os iões Fe(II) ocupam metade dos interstícios octaédricos e os iões Fe(III) ocupam de forma igual os restantes interstícios octaédricos e os interstícios tetraédricos. No que se refere à magnemite, a sua estrutura é semelhante à da magnetite sendo a oxidação do Fe(II) a Fe(III) compensada por lacunas (1).

As propriedades magnéticas destes óxidos, nomeadamente da magnetite e da magnemite dependem largamente não só da sua estrutura, mas também do tamanho das nanopartículas e da forma dessas nanopartículas. Em particular, a magnetite é ferrimagnética à temperatura ambiente, mas se as partículas forem menores do que 6 nm tornam-se superparamagnéticas, embora estas propriedades pareçam depender do método usado na síntese (2). Tendo em atenção que muitas das aplicações médicas destas nanopartículas estão intimamente relacionadas com as suas propriedades magnéticas é de extrema importância um controlo rigoroso do processo de síntese de modo a serem obtidas os materiais com as características desejadas.

As dimensões das partículas, como seria de esperar, influenciarão não só as propriedades magnéticas, mas têm também uma grande influência sobre a forma como se comportam *in vivo*. Por exemplo, diminuindo o diâmetro, a partícula pode passar para superparamagnética, o que pode ser uma vantagem no caso da molécula estar a ser sintetizada para fins imagiológicos (agente de contraste), mas também poderá ser prejudicial, uma vez que quanto menores são as dimensões destas partículas, menores são os tempos de semivida no organismo, aumentando assim a *clearance* sistémica podendo traduzir-se na impossibilidade de realizar exames mais morosos (3,4).

Estas nanopartículas têm uma superfície que pode ser funcionalizada, tanto para responder de diferentes formas a um campo magnético externo, como para adsorver certos polímeros, aumentando de forma exponencial as suas aplicações. O revestimento pode ser orgânico ou inorgânico, dependendo do fim para que se está a sintetizar as partículas. Materiais orgânicos permitem que à superfície adira matéria orgânica como polímeros de polietilenoglicol (PEG) ou mesmo anticorpos, enquanto que um revestimento inorgânico permite alterar o comportamento das partículas ao ser aplicado um campo magnético externo, levando a um controlo maior sobre os resultados e sobre a toxicidade das intervenções (3).

Devido à versatilidade que advém das suas propriedades únicas, o interesse na aplicação das nanopartículas de óxido de ferro na área médica tem crescido exponencialmente, quer seja na deteção/diagnóstico de patologias, quer seja no seu tratamento.

Estas nanopartículas podem ser utilizadas como veículos na entrega de fármacos uma vez que é possível funcionalizar a sua superfície para que sejam captadas por recetores no local de ação, sem que haja efeitos secundários de forma tão exacerbada e generalizada. A quimioterapia é uma das potencialidades destas partículas que pode usufruir da capacidade enquanto veículo das nanopartículas (3). Tanto a nível sistémico como local e com administração oral e intravenosa. A escolha entre qualquer uma destas vertentes dependerá do tipo de neoplasia que se está a abordar.

As nanopartículas mais estudadas desta família, magnetite e magnemite, por possuírem um campo magnético intrínseco é possível serem direcionadas promovendo a acumulação no local desejado, sem que estas se alastrem por zonas não desejadas e, assim restringindo os efeitos adversos. Esta condução dos óxidos é feita com a aplicação de um

campo magnético externo sobre a zona onde se deseja concentrar as partículas, ou sobre todo o percurso desde o local de administração até ao local de ação (5–7). Por exemplo, há a possibilidade de se fazer uma administração via aerossol, para tratamento de patologias relacionadas com os pulmões, e caso a patologia seja incidente em apenas um dos pulmões, pode-se aplicar um campo magnético externo num dos lados do tórax e as partículas, aquando da aspiração, deslocar-se-ão para um dos lados da traqueia, prevalecendo num dos pulmões (7).

A hipertermia é uma aplicação médica com grande potencial de desenvolvimento e em que as nanopartículas de óxido de ferro desempenham um papel fundamental. Este conceito implica o acumular de nanopartículas, quer seja por direcionamento magnético, ou por direcionamento por meio de recetores ou anticorpos (como referido anteriormente). Após acumulação das partículas no local de ação é aplicado um campo magnético externo variável, fazendo aumentar a agitação das partículas por resposta ao campo magnético e havendo com aumento da energia cinética um consequente aumento da temperatura por libertação da energia por esta via (7,8).

Com todas estas possibilidades, e muitas outras que não foram referidas, torna-se necessário criar um foco para a presente monografia. Assim, Este trabalho focar-se-á na descrição da constituição, síntese e funcionalização das nanopartículas de óxido de ferro, assim como a aplicação destas características em alguns métodos e procedimentos clínicos, sejam eles para diagnóstico ou tratamento. Iremos restringir-nos a determinadas patologias a serem referidas na aplicabilidade de certos métodos, que serão brevemente descritas e definidas para integração no caso.

2. Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de ferro

2.1. Métodos de síntese

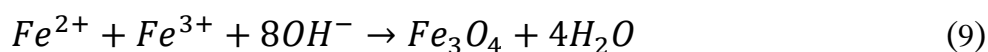
Diferentes métodos foram desenvolvidos ao longo das últimas décadas, visando a preparação de nanopartículas de magnetite. Ainda assim, há sempre espaço para melhorar o rendimento, porque sendo a síntese de magnetite pura relativamente simples de se alcançar, obter nanopartículas de magnetite com um tamanho específico de partícula e uma distribuição de tamanhos aceitável é uma tarefa mais desafiante. Diversos trabalhos de revisão que incluem uma variedade de estratégias de síntese destes materiais podem ser encontrados na literatura (1,3,9–11).

As nanopartículas de magnetite (e maghemite) podem ser preparadas com recurso a um grande número de procedimentos de síntese, contudo, somente os procedimentos mais utilizados serão descritos nas secções seguintes.

2.1.1. Co-precipitação

O método de co-precipitação é o mais utilizado e provavelmente o mais simples e eficiente para a preparação de magnetites (9,10). Estas nanopartículas são normalmente preparadas através da mistura de sais de Fe (II) e Fe (III) com uma proporção molar de Fe (II) / Fe (III) de 0,5 em meio aquoso. A precipitação ocorre, normalmente, num intervalo de pH compreendido entre o 8 e 14, pela adição de uma base (i.e., NaOH, NH₄OH) (1,11,12). A reação química que leva à formação da magnetite pode ser escrita como demonstrado na Equação 1:

Equação 1



O óxido de ferro obtido é recolhido por decantação magnética ou centrifugação e posteriormente tratado com ácido concentrado ou soluções alcalinas, de forma a promover a estabilização electrostática.

A principal vantagem deste método é a grande quantidade de nanopartículas que podem ser sintetizadas e algum controlo na dimensão média de partícula. Contudo, o controlo sobre a distribuição da dimensão de partícula é um pouco limitada, justificado pelo crescimento de cristais controlado por fatores cinéticos (9). A formação de nanopartículas segue os mecanismos comuns de nucleação e crescimento cristalino. Neste caso, um grande número de núcleos são formados simultaneamente a partir da solução homogénea, num processo denominado por “*burst nucleation*”, logo que as espécies alcançam uma supersaturação crítica, a qual é seguida por uma fase de crescimento cristalino lento. De forma a controlar a distribuição de dimensão das partículas, a formação de novos núcleos deve ser evitada durante esta segunda etapa segundo o modelo de LaMer (13).

A primeira síntese de nanopartículas controlada utilizando o método de co-precipitação foi reportado por Massart em 1981 (12). No decorrer deste trabalho, os autores mostraram a influência de diferentes parâmetros de síntese na produção, dimensão e poli-dispersão das nanopartículas.

As partículas de magnetite não apresentam elevada estabilidade em ambientes aquosos e podem transformar-se em maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) por oxidação na presença de oxigénio. A transformação controlada de magnetite em maghemite é executada frequentemente como um passo subsequente na preparação de nanopartículas de óxido de ferro (10). De forma a prevenir a oxidação de iões de Fe (II) é comum efetuar o processo de síntese sob um gás inerte.

Diferentes variações do método clássico de co-precipitação foram descritas na literatura (1). Entre elas, o uso de Na_2SO_3 parece favorecer o controlo da reação no que diz respeito à reação de oxidação de iões ferrosos, evitando o uso de um gás protetor (normalmente azoto). Neste caso, os iões ferrosos não são adicionados à mistura de síntese, mas, em vez disso, são gerados *in situ* pela redução parcial de iões férricos com Na_2SO_3 (14). A formação de complexos de iões férricos com SO_3^{2-} previne a subsequente oxidação.

Uma vez que a dimensão e a distribuição de tamanhos de nanopartículas são de elevada importância na maioria das aplicações (tais como aquelas que envolvam a magnetização), algumas estratégias foram desenvolvidas de forma a alcançar, pelo menos, um controlo parcial sobre estes parâmetros. A ideia chave passa por cobrir as nanopartículas com uma

porção orgânica (aniões orgânicos quelantes ou poliméricos) durante o processo de síntese de forma a prevenir crescimento futuro.

2.1.2. Métodos de Elevada temperatura

Os métodos de altas temperaturas que incluem decomposição hidrotérmica, solvo térmica e térmica, normalmente requerem que a mistura de síntese seja colocada num autoclave selado e aquecida a temperaturas bastante superiores ao ponto de ebulição do solvente e, por vezes, até a temperaturas acima da sua temperatura crítica. Variações deste método podem incluir o uso de um sistema contínuo envolvendo um reator de fluxo em contra-corrente (15).

Quando comparados com o método de co-precipitação, os métodos de alta-temperatura elevam o controlo de dimensão, distribuição de tamanho e configuração magnética das nanopartículas (10,16). Como no método de co-precipitação, diferentes aditivos (como o ácido oleico, sucrose, ácido (poli)acrílico, líquidos iónicos, oleilamina, polietileno glicol, 1-octadeceno, aminoácidos, ácido cítrico, etc.) foram utilizados de forma a promover a estabilização de nanopartículas e prevenir a agregação das partículas e, em alguns casos, para promover uma funcionalização num único passo (1,17–22).

As nanopartículas magnéticas podem ser preparadas de diversas formas envolvendo oxidação, redução ou co-precipitação de precursores de ferro. Entre os métodos descritos pode referir-se como exemplo de S. Ge e colaboradores (23) em que foi usado FeCl_2 e amónia. Variando as condições de reação e usando ar como oxidante foi possível a obtenção de nanopartículas de diferente tamanho. Com o mesmo objetivo Tian e colaboradores (24) usaram $\text{Fe}(\text{acac})_3$ como fonte de ferro, n-octolamina como redutor e n-octanol como solvente. O âmbito da abordagem hidrotérmica e solvo térmica foi expandida, sendo um dos principais objetivos de hoje a preparação de nanopartículas magnéticas com morfologias incomuns. Os trabalhos de J. Wan et al. (25), G. Thomas et al. (15) ou J. Liang et al. (26), entre tantos outros, são exemplos do potencial demonstrado por estes métodos, onde foram obtidos nanocristais mesoporosos, agregados de partículas com estrutura em forma de flor e cristais bem lapidados, respetivamente.

A decomposição térmica de precursores de ferro em solventes orgânicos, utilizando ácidos gordos ou aminas como estabilizadores, é outra estratégia que permite a preparação

de nanopartículas magnéticas monodispersas e com dimensão controlada com elevada cristalinidade (27), ainda que altas temperaturas sejam sempre um requisito. Estes métodos podem ser implementados em recipientes abertos ou fechados, dependendo do tipo de precursor de ferro, agente estabilizador da funcionalização adicionado e propriedades de textura esperadas.

Um procedimento comum envolve a preparação de um complexo oleato de ferro que é subsequentemente aquecido a uma elevada temperatura na presença de ácido oleico num solvente no ponto alto de fervura, como é descrito por Park (28) e Li (29). Nesta abordagem, a temperatura operacional depende da escolha do solvente. Por um procedimento semelhante, V. Patsula (30) e os seus colaboradores descrevem a preparação de nanopartículas de Fe_3O_4 superparamagnético, através da decomposição de complexo de gluconato de Fe (III), sintetizado no passo anterior. $\text{Fe}(\text{acac})_3$ é outro precursor de ferro que permite a implementação do método (31–34).

O Pentacarbonilferro tem sido usado como precursor de ferro porque é facilmente decomposto e o monóxido de carbono pode ser removido da mistura de síntese sem que haja a necessidade de acrescentar etapas complexas, contudo este composto é altamente tóxico, o que constitui uma limitação significativa. De forma a ultrapassar este problema e ainda conseguir utilizar de forma conveniente os complexos carbonilo, D. Amara e colaboradores (35) prepararam nanopartículas de magnetite através de decomposição térmica de $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$, que é um composto muito menos tóxico que $\text{Fe}(\text{CO})_5$ (35).

Os métodos de alta temperatura são adequados para o controlo de dimensão de partícula uma vez que o crescimento cristalino é principalmente alcançado numa etapa de temperatura elevada. Consequentemente, o crescimento cristalino pode ser facilmente parado com uma diminuição rápida da temperatura da reação. Outros parâmetros, como a razão de Fe/ácido oleico, o solvente utilizado e a adição de oleato de sódio têm também uma influência direta na conformação e dimensão da partícula (36,37).

A decomposição térmica de precursores de ferro também pode ser realizada em condições em que não haja solventes envolvidos, como é demonstrado por A. Asuha et al. (38), que prepararam nanocristais de magnetite através de decomposição térmica direta num recipiente fechado de complexo de ferro e ureia ($[\text{Fe}(\text{CON}_2\text{H}_4)_6](\text{NO}_3)_3$) (38). Utilizando este procedimento, o tamanho dos nanocristais é dependente da decomposição de temperatura. A ureia, um dos produtos da decomposição térmica do complexo inicial,

aparenta representar um papel chave na formação de magnetite pela redução parcial de íons de Fe^{3+} .

2.1.3. Métodos de emulsões de óleo-água

O método de emulsão de óleo-água tem sido usado para preparar nanopartículas de magnetite há várias décadas. Um tipo particular de emulsão é a micro emulsão de água em óleo (micro emulsão reversa), onde a fase aquosa é dispersa em micro gotas (tipicamente 1-50 nm de diâmetro) numa fase não-polar de hidrocarbono. Neste método, as gotas de água são estabilizadas por uma camada fina de tensioativo. Cada gota estabilizada é num ambiente confinado que pode impor estrangimentos cinéticos e termodinâmicos a reações químicas envolvidas na formação de nanopartículas e podem, por isso, atuar como nanoreatores. O tamanho das micelas pode ser controlado pela variação da relação água/tensioativo e, conseqüentemente, este processo oferece uma forma de controlar o tamanho e a distribuição de tamanho das nanopartículas de magnetite sintetizadas.

Sob agitação, as micelas colidem continuamente aumentando as fusões e quebras que fazem os diferentes precursores presentes em cada gota, eventualmente misturarem-se e iniciarem a reação (39). Utilizando este método, a formação de nanopartículas é habitualmente levada a cabo à temperatura ambiente, mas também pode ser efetuada a uma temperatura mais alta (limitada pelo ponto de ebulição do solvente orgânico) (40). Após a reação estar completa, o produto resultante pode ser recuperado depois da adição de diferentes solventes, como o metanol ou acetona, de forma a quebrar as micelas. Uma grande variedade de tensioativos como o brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), dodecilbenenosulfonato (NaDBS), Igepal CO-520, Triton-X 100 dodecilsulfato de sódio – SDS. Polioxietileno – Brij30, brometo de dodeciltrimetilamónio – DBAB, di-metileno – 1,2 – bis(brometo de dodecildimetilamónio), Aerosol OT (sulfosuccinato de diotil) foram usados para a preparação de nanopartículas de base de magnetite (41,42). Em alguns casos um co-tensioativo foi também utilizado.

O método tem sido demonstrado como adequado para a preparação de nanopartículas de magnetite puras e estruturas de cápside com núcleo de magnetite com diferentes compostos orgânicos e inorgânicos. Foi descrito pela primeira vez para a síntese de um

coloide de magnetite por M. Gobe et al. (9) que usaram micro emulsões de água/iso-octano e água/ciclo-hexano com Aerosol OT (sulfosuccinato de diotilo) e nonilfenil hexoxi-etileno como tensioativos. Desde então, uma grande diversidade de nanopartículas têm sido preparadas usando o método micelar abrangendo materiais metálicos e intermetálicos para óxidos metálicos quaternários.

No que diz respeito à síntese de nanopartículas de magnetite, esta abordagem apresenta muitas vantagens como a possibilidade de operar a baixas temperaturas, normalmente 20-70 °C, o tempo de reação, que tipicamente varia entre minutos a poucas horas, o controle adequado da forma e tamanho das partículas e uma distribuição estreita de dimensões de partículas. Como um exemplo típico T. Lu et al. (25) usaram diferentes tensioativos para preparar nanocristais de magnetite com dimensão de partícula compreendida entre 13 e 15 nm (dependendo do tensioativo usado) e um desvio padrão de tamanho de partícula de cerca de 2 nm. A síntese necessitou da preparação de uma solução de tensioativos numa mistura a 40 °C de n-hepano/n-hexanol. Os precursores de ferro, sulfato ferroso e cloreto férrico na forma de soluções aquosas foram adicionados à mistura. A temperatura foi aumentada até aos 70 °C e uma emulsão de amónia aquosa, com os mesmos solventes orgânicos, foi posteriormente adicionada. A solução escura foi mantida sob agitação por mais 3 horas a 70 °C e mais 2 horas à temperatura ambiente. Todo o procedimento foi realizado sob atmosfera de árgon de forma a prevenir a oxidação de iões férricos.

Várias descrições mostram que o método de micro emulsão apresenta uma grande variedade, quer seja independentemente ou incluído num procedimento mais complexo. Por exemplo, Vidal-Vidal et al. (43) relataram a preparação de nanopartículas magnéticas monodispersas revestidas com oleilamina obtida numa emulsão de água em óleo. (ciclo-hexano/Brij-97/fase aquosa)

2.1.4. Método Sol-gel

O método de Sol-Gel é baseado nas reações de hidrólise e condensação de precursores metálicos em solução, em condições que levam à formação de uma solução coloidal de partículas nanométricas. Reações de condensação e polimerização adicionais, levam a uma rede tridimensional de partículas discretas ou uma rede de polímeros, conhecidas por “gel molhado”. Normalmente, estas reações são realizadas a baixas temperaturas e assim,

tratamentos adicionais a temperaturas elevadas, podem ser necessários para obter a estrutura final.

As nanopartículas de magnetite têm sido preparadas por esta abordagem e, como de para outros tipos de nanopartículas, a estrutura e propriedades do gel são influenciados pelo solvente, temperatura, natureza, concentração dos precursores salinos usados, pH e agitação (44). Os precursores mais usados para a síntese de nanopartículas magnéticas são os alcóxidos de ferro e os sais de ferro (tais como cloretos, nitratos e acetatos), os quais são submetidos a várias formas de reações de hidrólise e policondensação em condições alcalinas ou acídicas.

Através deste método torna-se possível obter materiais com uma estrutura predeterminada de acordo com as condições experimentais, com bom controle de tamanho de partícula e homogeneidade dos produtos da reação (45). A possibilidade de incorporar moléculas, que mantêm a sua estabilidade e propriedades dentro da matriz de sol-gel, faz deste método particularmente adequado para a preparação de nanopartículas *core-shell* (invólucro-núcleo) e compostos orgânicos-inorgânicos envolvendo óxidos magnéticos. Por exemplo, Hasanpour et al. (46) prepararam nanopartículas de magnetite com tamanho médio de 10 nm a partir de nitrato de ferro nona-hidratado e etilenoglicol. A suspensão coloidal (sol) foi obtido a 40 °C, sob agitação por 2h e o gel foi obtido a 80 °C; uma secagem subsequente foi realizada a 150 °C por 20 h e a recozimento foi feita a diferentes temperaturas (350-650 °C) por outras 2h. A temperatura de recozimento desempenha um papel importante no processo porque induz diferentes formas de cristalização, tamanho e também propriedades magnéticas das partículas. Os autores deste trabalho demonstraram que este método de síntese pode ser utilizado para preparação num único reator (*one pot synthesis*) de materiais nanocompósitos Fe₃O₄/ZnO. Compostos de Fe_xO_y-SiO₂ têm sido largamente preparados através de procedimentos que envolvem um passo de sol-gel como é demonstrado por Raileanu et al. (47).

Procedimentos de sol-gel menos convencionais foram também adotados por diferentes autores para preparar nanopartículas de magnetite. Por exemplo, Lemine et al. (48) sintetizaram nanopartículas de magnetite com uma dimensão de partícula média de 8 nm utilizando um método sol-gel modificado sob condições supercríticas de álcool etílico e Sciancalepore et al. (49) prepararam partículas de magnetite monocristalinas com uma dimensão compreendida entre 4 e 8 nm utilizando uma via de síntese sol-gel não-hidrolítica assistida por micro-ondas.

2.1.5. Método Poliol

O método de poliol compreende um poliol como solvente onde um precursor de ferro é suspenso. A mistura é agitada e aquecida a uma determinada temperatura que é limitada pelo ponto de ebulição do poliol utilizado. Quando comparado com o método de sol-gel, esta abordagem dá uso a uma reação de redução do precursor de ferro em vez da oxidação que ocorre no processo de sol-gel. Este é o motivo pelo qual o método é também chamado de método de sol-gel inverso. Os polióis, como o etilenoglicol ou trietilenoglicol, podem dissolver compostos inorgânicos devido às suas constantes dielétricas elevadas e podem oferecer um espectro alargado de temperaturas de trabalho devido aos pontos de ebulição relativamente elevados. Neste processo, os polióis são utilizados também como agentes redutores e estabilizadores que previnem a agregação de partículas (1,37).

Cai e Wan (50) investigaram o efeito da natureza do solvente poliol (etilenoglicol, di-etilenoglicol, trietilenoglicol e tetra-etilenoglicol) na preparação de nanopartículas de magnetite monodispersas utilizando $\text{Fe}(\text{acac})_3$ como precursor de ferro. Os autores referidos demonstraram claramente que a natureza do poliol utilizado tem um papel central na morfologia e estabilidade das nanopartículas. De entre todos os polióis testados, somente o trietilenoglicol pode produzir nanopartículas de magnetite não aglomeradas com forma uniforme e uma distribuição de tamanho estreita. Mais recentemente, Jaime Veja-Chacón et al. (51) estudaram o efeito de outros parâmetros de síntese na formação de nanopartículas de magnetite utilizando trietilenoglicol. Este estudo indicou que a natureza e concentração dos sais precursores influenciam o mecanismo de formação das nanopartículas e, conseqüentemente, influencia o tamanho, forma e saturação de magnetização das nanopartículas.

Nanopartículas preparadas através do método de poliol podem ser facilmente dispersas em meio aquoso e outros solventes polares porque a camada hidrofílica de ligandos poliol os cobre.

2.1.6. Outros Métodos

Vários outros métodos têm sido usados na preparação de nanopartículas magnéticas ou nanopartículas magnéticas contendo compostos, incluindo a síntese assistida por micro-ondas, sonólise, síntese por injeção por fluxo, métodos eletroquímicos, métodos de

aerossol/vapor e biossíntese. Alguns destes métodos podem ser compreendidos como melhorias dos métodos descritos acima. Por exemplo, aquecimento sob radiação de micro-ondas pode reduzir significativamente o tempo de processamento e o custo energético devido ao rápido aquecimento da mistura de síntese resultante da forte agitação da reorientação de moléculas em fase com a excitação do campo elétrico (1). Recentemente, Kubrakova et al. (52) usaram radiação de micro-ondas (80 °C e 8-15 min de tempo de irradiação) para promover a formação de magnetite por co-precipitação. Através deste procedimento, os autores obtiveram partículas de magnetite, quer simples, quer com superfície modificada com ácidos oleico e mercaptopropiônico e brometo de cetiltrimetilamonio. *Hot spots* de temperatura muito alta podem ser gerados através do uso de ultrassom. Estes *hot spots* resultam do colapso rápido de cavidades geradas pelos ultrassons e podem ser usados para preparar nanopartículas magnéticas por decomposição de precursores de ferro como demonstrado por Abu Mukh-Qasem (53) ou co-precipitação como é demonstrado por Nan Wang (54).

Métodos de injeção por fluxo consistem em mistura segmentada ou contínua de reagentes sob um regime de fluxo laminar num reator capilar. Estes métodos são, na realidade, métodos de co-precipitação modificados, mas exibem uma elevada reprodutibilidade, elevada homogeneidade de mistura e uma oportunidade para um controlo externo preciso do processo (1,44). Métodos eletroquímicos podem também apresentar algumas vantagens em relação a outros métodos de síntese, nomeadamente a elevada pureza do produto e a possibilidade de controlar o tamanho de partícula pelo ajuste da corrente ou potencial aplicado ao sistema (55,56). A pirrólise por spray e laser, exemplos de tecnologias de aerossol para a síntese de nanopartículas magnéticas, são processos químicos contínuos que permitem uma produção a uma taxa elevada. A pirrólise por spray consiste em pulverizar uma solução de sais férricos e um agente redutor num solvente orgânico numa série de reatores, onde o soluto do aerossol condensa, o solvente evapora e a reação de pirrólise toma lugar. O resíduo seco resultante consiste em partículas cujo tamanho depende do tamanho inicial e a distribuição de tamanho das gotas originais (1,44). Nanopartículas magnéticas também têm sido sintetizadas por uma abordagem biossintética onde bactérias magnetostáticas e bactérias redutoras de ferro, como *Geobacter metallireducens*, *M. gryphiswaldense*, etc., são utilizadas. Ainda assim, o mecanismo de formação de partículas por organismos vivos

não está completamente compreendido, o que previne o total controlo do tamanho e forma dessas partículas.

Todos os métodos descritos acima apresentam vantagens e desvantagens em termos de simplicidade e controlo de forma, tamanho e distribuição de tamanho das partículas. Aquando da escolha do método de síntese, os requisitos da aplicação final em termos de quantidade, tamanho, forma, distribuição de tamanho, superfície e propriedades magnéticas das nanopartículas devem ser tidos em consideração.

Tabela 2.1 - Comparação das características das nanopartículas de acordo com o método de síntese utilizado (39).

Características da nanopartícula de óxido de ferro	Método de síntese das nanopartículas			
	Aerosol/ vapor	Solução em massa	Sol-gel	Microemulsão
Tamanho e distribuição de tamanho	5 – 60 nm com larga distribuição	10 – 50 com larga distribuição	20 – 200 nm com larga distribuição	4 – 15 nm com distribuição muito pequena
Morfologia	Esférica	Esférica (grandes agregados)	Esférica com alta porosidade	Cúbica ou esférica (sem agregação)
Vantagens	Alta taxa de produção	Podem ser sintetizadas grandes quantidades	Útil na sintetização de nanopartículas híbridas. É possível controlar o tamanho e forma	Propriedades uniformizadas. Permite modulação da dimensão
Desvantagens	São formados grandes agregados	Oxidação de magnetite a maghemite descontrolada	Normalmente o produto final contém componentes da matriz sol-gel na superfície	Os agentes tensioativos são difíceis de remover. Somente pequenas quantidades de óxido de ferro é sintetizado

Como se pode concluir com base em todos os métodos descritos acima, de acordo com a utilidade que se espera obter das nanopartículas, pode-se optar por certos métodos em detrimento de outros, que permitam controlar as características críticas que preconizam o sucesso da sua utilização, como se pode ver na Tabela 2.1. Para cada aplicação terapêutica ou de diagnóstico, determinadas características das nanopartículas têm maior ou menor peso na decisão de sucesso ou insucesso da aplicação. Além de fatores decisivos como o tamanho, superfície e núcleo, há que ter em conta o custo e o tempo de preparação.

2.2. Estabilização e modificação da superfície

A estabilização de nanopartículas magnéticas como uma suspensão magnética coloidal é um problema central que tem de ser considerado qualquer que seja a aplicação subsequente (1,10,44). Neste intervalo de tamanho de partícula, é conhecido que estas tendem a agregar de forma a reduzir a energia de superfície. Por outro lado, a estabilidade química, nomeadamente a das nanopartículas magnéticas, tem de ser assegurada, uma vez que a fácil oxidação dos átomos de ferro na estrutura da magnetite causa alterações ao nível das propriedades magnéticas. Finalmente, a cobertura da superfície das nanopartículas com moléculas apropriadas torna-se uma necessidade se a aplicação médica está em vista.

Os átomos de ferro na superfície das partículas atuam como ácidos de Lewis e, por isso, coordenam-se com átomos de moléculas que podem doar um par de eletrões. Em soluções aquosas, a água coordena-se com o ferro dissociando-se facilmente, dando origem a uma superfície funcionalizada por grupos hidroxilo. Os grupos hidroxilo são anfotéricos e a superfície das nanopartículas pode apresentar uma carga positiva ou negativa, dependendo do pH da solução. Desta forma, é possível funcionalizar as nanopartículas de diferentes formas recorrendo a diferentes materiais ligados à superfície, como se pode observar na Figura 2.1.

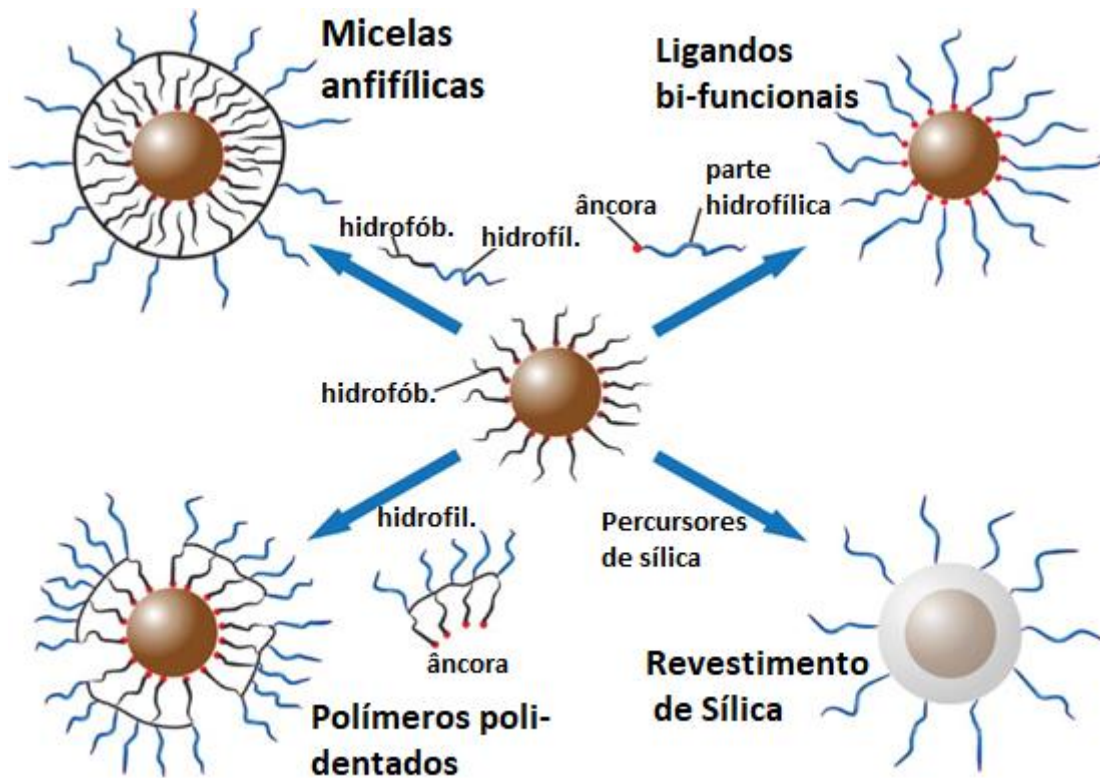


Figura 2.1 - Diferentes estratégias para a funcionalização das nanopartículas de óxido de ferro (10).

Todos os métodos de síntese descritos acima levam em consideração pelo menos o problema de agregação e fazem uso de aditivos para prevenir que isto ocorra, tais como ácidos oleico ou cítrico. Ainda assim, na maioria dos casos, os métodos usados para preparar nanopartículas monodispersas com elevada cristalinidade usam tensoativos hidrofóbicos para cobrir a superfície das partículas, o que as torna insolúveis em água. Uma aplicação médica ou biológica direta destas nanopartículas não é normalmente possível e a modificação da superfície é necessária de forma a obter materiais magnéticos biocompatíveis dispersáveis em água e estáveis quimicamente. As estratégias mais comuns para alcançar estes requisitos envolvem a formação de estruturas invólucro-núcleo (*core-shell*) onde a superfície de nanopartículas magnéticas é modificada com micelas tensoativas, ligandos bi-funcionais, ligandos poliméricos ou sílica (neste caso, o uso de sílica pode ser um passo intermédio para a subsequente funcionalização), como é ilustrado na Figura 2.1. Estas modificações podem ser alcançadas quer por alteração do ligando, quer por cobertura orgânica ou inorgânica (1,10,57,58). A Tabela 2.2 apresenta algumas moléculas com interesse em medicina, que podem ser usadas para funcionalizar as nanopartículas de óxido de ferro.

Tabela 2.2 - Proteínas/Ligandos direcionadores selecionados que podem ser usados para a derivatização de nanopartículas magnéticas para diversas aplicações biomédicas (39).

PROTEÍNA/LIGANDO	ATIVIDADE FUNCIONAL	REFERÊNCIA
Transferrina	Largamente aplicada como um ligando de direcionamento ativo de agentes anticancerígenos, proteínas e genes para células proliferativas primárias, por recurso a recetores de transferrina.	(59–62)
Lactoferrina	Estruturalmente semelhante à transferrina. Atua como um agente anti infecção, um modulador da resposta inflamatória e da absorção de ferro e é também uma proteína imuno-reguladora.	(63,64)
Fator de crescimento transformante – alfa (TFG-alfa)	Promove a proliferação e diferenciação de células e pode ser importante para a cicatrização de feridas.	(65)
Insulina	Uma hormona que regula os níveis de glucose no sangue, é uma proteína de pequenas dimensões.	(66)
Fator de crescimento de nervo (NGF)	Promove a superação da neurite e a sobrevivência de células neuronais.	(67)
Ceruplasmina	Principal transportador de cobre no plasma, o que desempenha um papel importante na homeostase de ferro e é também um antioxidante para um variedade de radicais livres.	(63,64)
Pululano	Alta solubilidade em água, não apresenta toxicidade, muito útil como um expansor de plasma, não imunogénico, sem propriedades antigénicas. Também existem evidências de <i>uptake</i> hepático de pululano mediado por recetores em ratos.	(68)
Elastina	Proteína reticulada na matriz extracelular que providencia elasticidade para vários tecidos.	(69)
Albumina	A principal proteína do sangue, liga-se a uma grande variedade de compostos lipofílicos incluindo esteróides.	(70)
Péptido-TAT	Péptido que atravessa a membrana celular, melhora a entrega intracelular de fármacos.	(71,72)
Péptido-RGD	Direciona, preferencialmente, células cancerígenas, fraco potencial imunogénico.	(73)

2.3. Caracterização

O comportamento biológico e magnético das nanopartículas depende do seu tamanho, forma, polidispersividade, natureza e pureza das fases presentes, microestrutura e tipo de cobertura. Uma abordagem politécnica é, assim, de elevada importância para que se alcance uma caracterização adequada que, por sua vez, é essencial para a interpretação correta de dados experimentais.

A difração de raios-X (método de pó) (XRD) é uma técnica central para a caracterização de nanopartículas magnéticas. É uma técnica baseada na difração de radiação-X por um conjunto de planos de difração determinados pelo rearranjo espacial dos átomos no cristal. Isto permite distinguir fases cristalinas com diferentes arranjos estruturais que darão origem a diferentes padrões de difração. Ainda que em alguns casos a resolução da estrutura possa ser conseguida, o procedimento mais comum é a comparação do padrão de difração experimental com padrões existentes em bases de dados apropriadas.

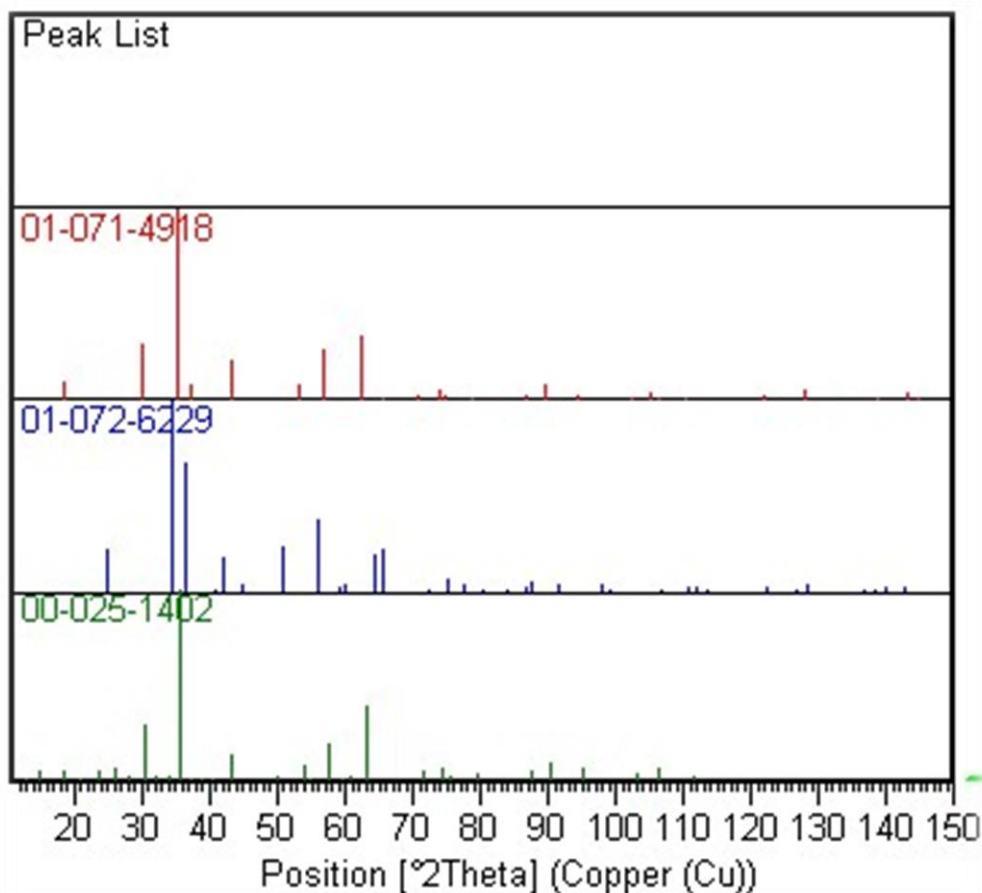


Figura 2.2 - Fichas da base de dados ICDD PDF2 maghemite (verde), hematite (azul) e magnetite (vermelho).

A hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), a maghemite ($\lambda\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e a magnetite (Fe_3O_4) têm um conjunto de propriedades único que faz delas os mais promissores óxidos de ferro para aplicações técnicas e biológicas. No que diz respeito à estrutura do cristal, a maghemite e a magnetite apresentam um rearranjo similar, mas enquanto a magnetite compreende tanto íons de ferro divalentes como trivalentes, a maghemite contém somente íons de ferro trivalentes. A maghemite é assim frequentemente considerada como uma magnetite oxidada (1). Esta similaridade estrutural torna os padrões XRD consideravelmente semelhantes no que diz respeito ao pico mais intenso (Figura 2.2), e, em combinação com a baixa intensidade e amplitude dos picos que são normalmente obtidos com amostras de nanopartículas, torna a identificação das fases um pouco difícil. Levando em consideração que a maghemite é facilmente obtida a partir da magnetite através de uma reação de oxidação durante o processo de síntese, um cuidado especial deve ser tido em conta na obtenção do padrão e identificação da fase.

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é usualmente utilizada para avaliar o tamanho, distribuição de tamanho e forma das nanopartículas (44). Esta técnica implica uma análise por tratamento de imagem num número estatisticamente significativo de partículas. Deve ser tida especial atenção aquando da preparação de amostras porque pode-se induzir a agregação dos colóides e, sendo assim, as medições TEM podem não refletir o tamanho e a distribuição em solução. O estudo do rearranjo da microestrutura local e a superfície atômica podem ser estudadas por microscopia eletrônica de transmissão de alta-resolução. O tamanho de partícula é frequentemente avaliado por dispersão dinâmica da luz (DLS) (9). A medição do coeficiente de difusão de nanopartículas em solução permite determinar o raio hidrodinâmico de uma esfera correspondente e a polidispersividade da solução coloidal, desde que o fenómeno de agregação não ocorra no solvente.

A espectroscopia de Mössbauer é uma técnica específica de espectroscopia que, no âmbito do tema das nanopartículas de óxido de ferro, pode ser utilizado para relacionar os resultados estruturais e morfológicos obtidos por XRD, espectroscopia IV e TEM com as interações magnéticas versus a temperatura(1), como é demonstrado no trabalho realizado por Raileanu et al. (45).

Contudo, esta técnica é referida em diversos trabalhos como os de Raileanu et al. (45) e O. M. Lemine et al. (48) como sendo uma técnica complementar às demais utilizadas. Esta é utilizada como intermediária de correlação entre os resultados das restantes

técnicas, ainda que com resultados bastante significativos e assertivos, permitindo alcançar conclusões definitivas quanto aos aspectos das nanopartículas considerados mais importantes durante a sua síntese.

Um espectro de Mössbauer é obtido pela quantificação da energia que chega à matriz de detecção (normalmente Ródio [Rh]) que é bombardeada com a energia gama libertada pelas partículas após esta ser emitida a partir de um isótopo radioativo (comummente cobalto [Co]). Caso as partículas tenham um núcleo livre, a energia libertada quando há a emissão de um fónon (fotão de radiação gama) provoca um recuo no núcleo, à semelhança de uma arma de fogo, quando o projétil abandona o cano a energia de propulsão do projétil provoca um recuo da arma em si, como justificado pela segunda lei de Newton, o par ação-reação. Esta sequência de eventos é exemplificada na Figura 2.3.

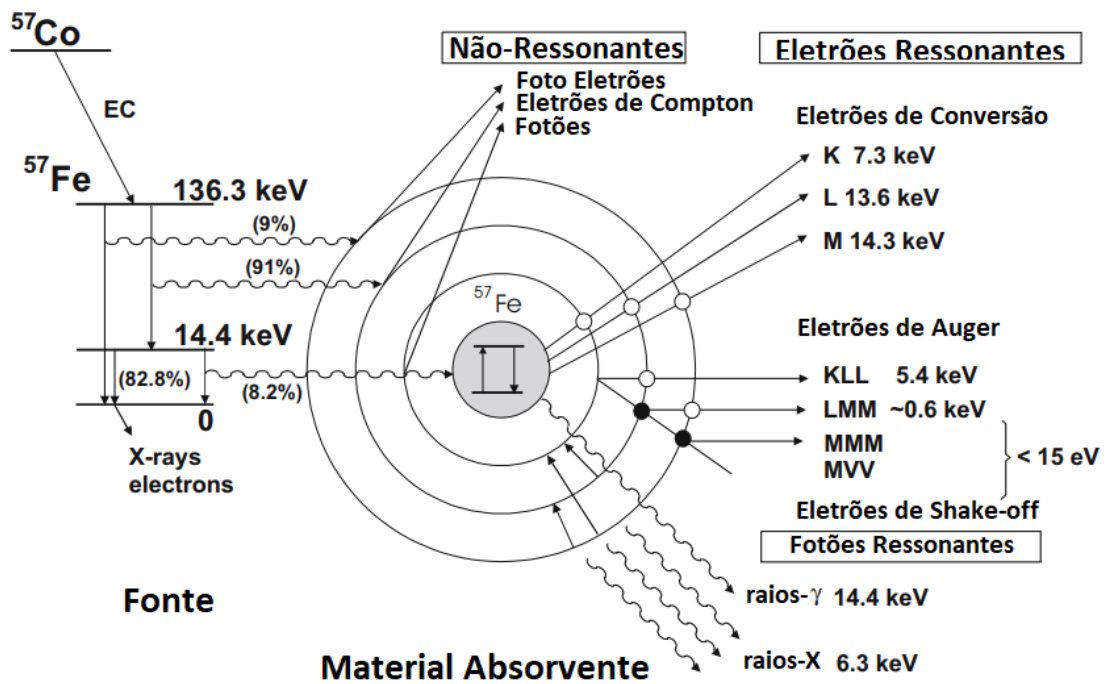


Figura 2.3 - Os vários processos de backscattering para o ^{57}Fe após a ressonância da absorção de um incidente g-quantum.

À semelhança de várias outras técnicas de espectroscopia, a espectroscopia de Mössbauer pode ser aplicada como método de absorção ou de emissão. Para as nanopartículas magnéticas, esta técnica é aplicada como método de absorção, quantificando a radiação absorvida pelas partículas, quando atingidas com radiação gama. Para que uma partícula consiga absorver a radiação gama é necessário que tenha o núcleo livre, para que o recuo resultante da emissão possa acontecer, isto não é observável em partículas com núcleo cristalino pois têm uma estrutura fixa, impedindo o recuo da emissão (74).

Como referido anteriormente, o tamanho das partículas e o seu comportamento magnético é de elevada importância no que se traduz na sua aplicação nas diversas áreas. Esta técnica de espectroscopia permite aferir a conformação estrutural das partículas sintetizadas e prever o seu comportamento magnético sob aplicação de um campo magnético externo.

Dependendo da natureza da cobertura e os objetivos da caracterização, uma variedade de outras técnicas podem ser utilizadas. Isto inclui a espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR), a análise termogravimétrica (TG) e a calorimetria diferencial (DSC) e a ressonância magnética nuclear (RMN), entre outras.

3. Aplicações Terapêuticas

3.1. Hipertermia

A hipertermia é uma das várias aplicações estudadas na última década das nano partículas de óxido de ferro (75,76). Esta técnica baseia-se na propriedade magnética intrínseca das partículas e da sua resposta a um campo magnético variável.

Desta forma, é impossível explicar-se o princípio físico-químico desta técnica sem primeiro se entender o comportamento magnético das nano partículas, os tipos de magnetismo que são possíveis inculir nas partículas e como estes reagem a diferentes tipos de campos magnéticos externos.

3.1.1. Magnetismo

Um material magnético pode ter, como referido, um comportamento magnético que pode ser caracterizado como: Diamagnetismo, Paramagnetismo, Ferromagnetismo, Antiferromagnetismo e Ferrimagnetismo (7).

Toda a matéria tem uma propriedade considerada como básica, o Diamagnetismo. Esta propriedade foi observada em materiais sem momento magnético, ou seja, sem elétrons desemparelhados nas orbitais (7). A suscetibilidade magnética de um material diamagnético é independente da temperatura (7,28,77–79).

O Paramagnetismo é observado em materiais com elétrons desemparelhados em orbitais parcialmente preenchidas, desta forma possuindo um momento magnético em rede pois, quando um campo magnético externo é aplicado, não há uma orientação comum e sim uma rede dispersa de momentos magnéticos. Em materiais com esta característica magnética a eficácia de um campo magnético aplicado é oposta pela propriedade aleatória da temperatura, a qual resulta, conseqüentemente, numa suscetibilidade magnética dependente da temperatura. Contudo, quando o campo magnético é removido, estes materiais apresentam propriedades diamagnéticas com magnetização igual a zero. Em suma, pode-se afirmar que o paramagnetismo é uma propriedade de materiais que têm momentos magnéticos atômicos desacoplados (7,18,77,80,81).

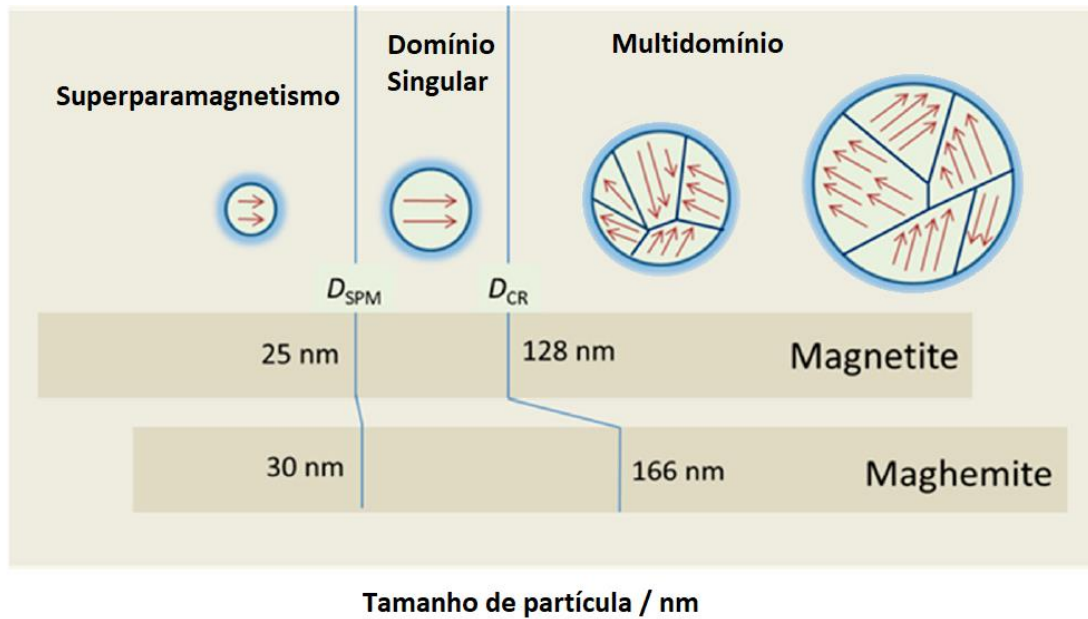


Figura 3.1 - Regimes magnéticos de magnetite e maghemite em função do seu tamanho (superparamagnético, domínio singular e multidomínio). (86)

Quando se tratam de materiais com momentos magnéticos atômicos alinhados e com magnitude equivalente, no que diz respeito ao seu comportamento magnético designa-se por Ferromagnetismo. Materiais ferromagnéticos como o ferro, níquel e cobalto, apresentam um fenómeno onde os *spins* dos elétrons não emparelhados se alinham paralelamente uns com os outros. Mesmo na ausência de um campo magnético, são registadas magnetizações espontâneas em materiais ferromagnéticos. Ímãs duros são materiais que apresentam magnetização permanente, mesmo quando o campo aplicado é removido (7,77,82).

Como o próprio nome indica, um material que apresente um comportamento antiferromagnético, apresenta um momento magnético rearranjado numa forma antiparalela. Os momentos magnéticos têm igual momento magnético atômico mas em sentidos opostos (82,83). A propriedade antiferromagnética de um material aumenta com o aumento da temperatura. Contudo, quando a temperatura ultrapassa a temperatura de Néel, o material apresenta propriedades paramagnéticas devido à flutuação aleatória dos momentos magnéticos atômicos alinhados em sentidos opostos, levando ao desaparecimento da sua ordem de longa-distância (7). A temperatura de Néel define-se como a temperatura correspondente à quantidade de energia térmica necessária para que

um material antiferromagnético sofra a desorientação magnética microscópica e se torne, assim, num material paramagnético (84).

O Ferrimagnetismo é uma propriedade demonstrada por materiais nos quais os momentos magnéticos dos átomos ou iões estão organizados numa forma não paralela quando nenhum campo magnético é aplicado e a temperatura é inferior à temperatura de Néel (83,85). Contudo, os materiais ferrimagnéticos tornam-se paramagnéticos acima da temperatura de Néel (7).

Contudo, existe mais uma denominação para um comportamento magnético que deriva de um dos conceitos descritos acima, o Superparamagnetismo. Este comportamento está fortemente ligado a dois conceitos: às dimensões do material magnético e à coercividade.

A coercividade de um material ferromagnético refere-se à intensidade necessária do campo magnético aplicado para reduzir a magnetização do material até zero. Assim, a coercividade é a medida de resistência de um material ferromagnético à desmagnetização e é uma das características mais interessantes das nanopartículas de óxido de ferro. Como referido, a coercividade é fortemente dependente do tamanho das partículas, a qual aumenta até ao seu máximo e depois decresce para zero à medida que o tamanho da partícula se reduz, como pode ser observado na Figura 3.2.

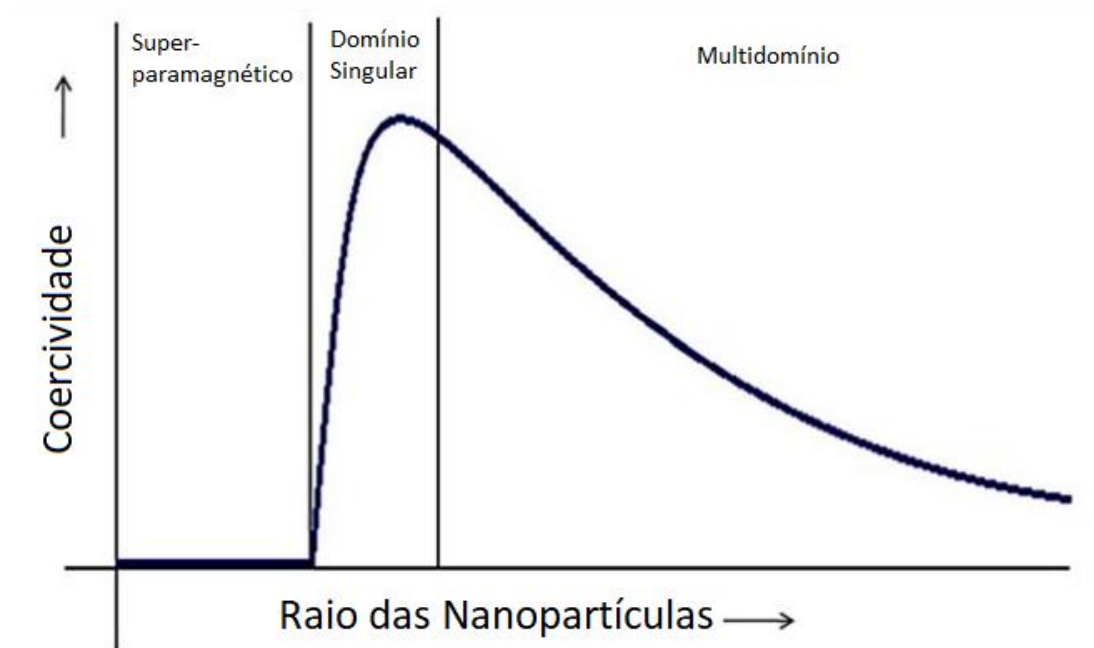


Figura 3.2 - Ilustração esquemática da relação entre a coercividade e o raio das nanopartículas (86).

As nanopartículas superparamagnéticas (SPMNP) têm sido alvo de estudo para várias aplicações biomédicas pelo seu comportamento magnético único, boa biocompatibilidade, modificação de superfície fácil e baixo custo (87).

Neste caso podemos dizer que a possibilidade de se reverter a magnetização da molécula, sem que haja histerese, ou seja, sem que haja preservação da deformação no momento magnético que resulta da aplicação de um campo magnético externo, evitando a agregação das partículas, quer enquanto estão armazenadas, quer após administração intra-venosa (3,87).

Em suma, podemos concluir que a síntese de nanopartículas de óxido de ferro com determinadas características magnéticas permitem diferenciar as aplicações de acordo com as necessidades magnéticas da aplicação em vista.

3.1.2. Aumento da temperatura *in situ*

A utilidade da hipertermia, enquanto método terapêutico, tem sido estudada no âmbito das doenças neoplásicas, mais especificamente nas cerebrais e na dificuldade de fazer chegar fármacos ao local, dificuldade esta garantida pela barreira hematoencefálica.

D. Chang et al. (88) define a hipertermia como a leve elevação da temperatura, de forma controlada, até valores entre os 40 a 43 °C, de forma a provocar a morte celular de células cancerígenas e podendo melhorar os efeitos da radioterapia e quimioterapia (89). Contudo, estes investigadores afirmam que o alcance de todo o potencial das nanopartículas de óxido de ferro como tratamento clínico, tem sido barrado pela incapacidade dos métodos de tratamento atuais de se restringir ao aquecimento das células cancerígenas e somente estas células. Como seria de esperar, sem uma barreira que impeça a energia sob a forma de calor de atingir as células saudáveis adjacentes às células neoplásicas, esta energia atua, da mesma forma que nas células a eliminar, nas células saudáveis, sendo assim necessário pesar os prós e contras da sua utilização em terapêutica anti neoplásica (88).

Existem diferentes formas de provocar a morte celular através da hipertermia e, segundo Dewey et al. (90) e Roizin-Towle et al. (91), não existe uma diferença na sensibilidade térmica entre células malignas e saudáveis. Estes investigadores conduziram uma experiência onde cultivaram células dos ovários de hamsters chineses *in*

in vitro e fizeram variar a temperatura e a duração da exposição a essa temperatura (88). A efetividade e homogeneidade da hipertermia recebe, assim, uma grande relevância, uma vez que apenas o aumento de 0,5 °C é suficiente para causar um impacto significativo na viabilidade da célula alvo, como se pode aferir pela Figura 3.3 (90).

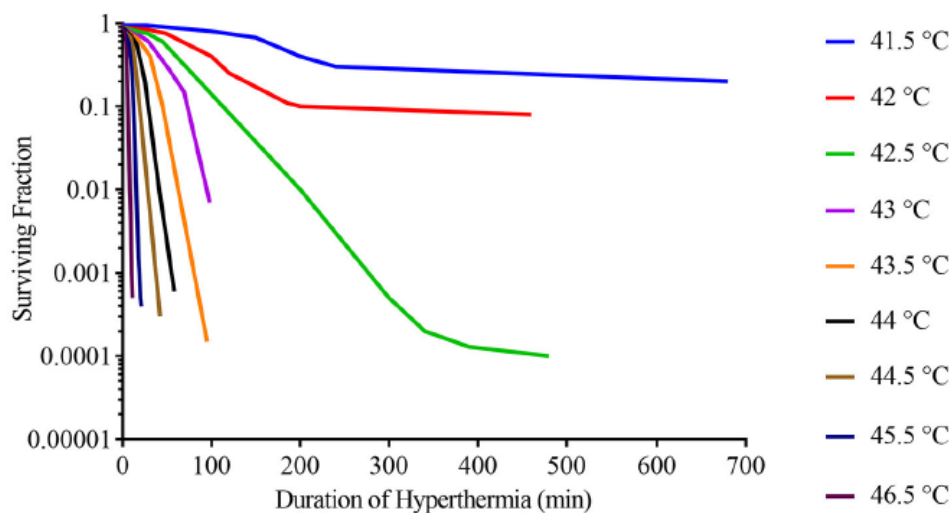


Figura 3.3 - Curvas de sobrevivência de células de ovário de hamster Chinês, aquecidas a diferentes temperaturas para diferentes intervalos de tempo. Adaptado de Dewey et al. (1997).

Os investigadores Wust et al. e van der Zee (89,92) procuraram explicar a redução da viabilidade de uma célula após ser exposta a um tratamento por hipertermia. É descrito nos seus trabalhos que um dos mecanismos que possivelmente explicam a perda de função recaem sobre a desnaturação proteica a determinadas temperaturas (89,92). Lepock et al. (93) descrevem que a desnaturação proteica ocorre a aproximadamente 40 °C e que a temperaturas superiores uma maior porção de proteínas será desnaturada. Uma pequena percentagem de proteínas celulares é desnaturada num intervalo de temperaturas de 40 a 42 °C, contudo, Borrelli et al. (94) afirma acreditar-se que algumas destas proteínas se vão co-agregar a proteínas nativas e, assim, aumentar significativamente o nível de agregação. É ainda postulado que, esta combinação de desnaturação induzida pelo aumento da temperatura e a subsequente co-agregação entre proteínas, seja a justificação para o efeito da hipertermia nas diversas reações em cadeia como a inativação da síntese proteica, a progressão do ciclo celular e a reparação do ADN (90,93,95).

Após compreensão dos diferentes tipos de magnetismo possíveis de obter com diferentes nanopartículas e das suas “dependências”, percebemos que para a utilização das nanopartículas de óxido de ferro na técnica de hipertermia estas devem ter um

comportamento magnético superparamagnético. Esta exigência deve-se ao facto de que o aumento da temperatura resulta de um aumento da energia cinética das partículas no local onde estas foram acumuladas. Têm sido conduzidos estudos no sentido de utilizar esta propriedade nos tumores cerebrais, como mencionado, provocando uma intencional acumulação das nanopartículas no próprio tumor e depois aplicando um campo magnético variável (AMF), que resulta num aumento da temperatura e, calcula-se, na destruição das células tumorais, sem efeitos colaterais para as células saudáveis adjacentes. (3)

O aumento da temperatura, em termos científicos, resulta do mecanismo de relaxamento de Néel quando as partículas superparamagnéticas estão sob influência de um AMF (3). O mecanismo de relaxamento de Néel consiste, por exemplo, numa partícula com domínio magnético singular, ter esse mesmo domínio orientado numa direção de fácil magnetização e que, ao ser aplicado um campo magnético externo, o momento magnético dessa partícula irá rodar para uma orientação mais próxima da do campo externo aplicado, sem que haja rotação da partícula. Quando o campo magnético é retirado, essa partícula vê o seu momento magnético retomar a posição original, por outras palavras, relaxando para o estado de equilíbrio, libertando energia sob a forma de calor. O tempo de relaxação de Néel (τ_n) aumenta exponencialmente com o aumento de tamanho das nanopartículas, como se pode observar na

Equação 2 (96):

Equação 2

$$\tau_n = \tau_0 e^{\frac{K_{eff}V}{k_B T}}$$

R. L. Fèvre et al. (97) desenvolveram um estudo comparativo entre as nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas pelos métodos químicos e as nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas biologicamente. Neste trabalho, é proposto que as nanopartículas sintetizadas com recurso a bactérias magnetostáticas (chamadas magnetossomas), são mais eficientes que as nanopartículas químicas no uso em tratamentos por hipertermia e podem ser utilizadas para métodos de diagnóstico. Estas nanopartículas sintetizadas

biologicamente, foram revestidas com uma camada de poli-L-lisina (M-PLL) sob condições estéreis, para que um estado de biocompatibilidade e estabilidade de suspensão seja alcançado. A capacidade anti tumoral de ambos tipos de nanopartículas, foi comparada pela administração de suspensões compostas por 25 μg de ferro por mm^3 de tumor, de M-PLL ou IONPs, no centro de tumores de glioblastomas GL-261 altamente agressivos, com tamanhos compreendidos entre 50 e 150 nm (98–101). Com base em outros estudos (102), estima-se que 0,5 g de magnetossomas por paciente sejam o necessário para o tratamento de glioblastomas utilizando hipertermia magnética. Este novo método remove o problema das endotoxinas, presentes na superfície da cápside bacteriana. É então proposto que é possível aumentar o fator de produção de magnetossomas num fator de 150 se se substituir a estirpe de bactérias AMB-1 para a MSR-1 (97).

S. Toraya-Brown et al. (103) postularam que no tratamento local de tumores com recurso ao método de hipertermia magnética induz a resistência contra tumores distais e secundários garantida por células T-CD8⁺.

Os linfócitos T CD8⁺, também conhecido como linfócito T citotóxico, tem como principal função no organismo humano eliminar células infetadas por parasitas intracelulares. Ao reconhecer um antígeno como não próprio do indivíduo, este linfócito liberta grânulos que danificam a estrutura das células adjacentes, assim como fatores como o IFN- γ e o TNF- α , que induzem a apoptose na célula alvo (104). Em 2016 um grupo de investigadores holandeses e noruegueses realizaram um ensaio clínico onde coletaram células T do sistema imunológico de um indivíduo doador saudável, administraram num doente com cancro e detetaram que as células T foram capazes de reconhecer células anómalas (neoplásicas) (105,106).

O conceito no qual Toraya-Brown e colaboradores se basearam foi que as células cancerígenas que são submetidas a stress térmico libertam um tipo de proteínas denominado por *heat-shock proteins* (proteínas de choque térmico), ou HSPs, e estas ligam-se e ativam células apresentadoras de antígenos (APCs) (107–109). Uma vez que as HSPs estão normalmente ligadas aos antígenos do cancro, quando o complexo HSP-Antígeno é fagocitado pelas APCs, estas últimas podem apresentar o antígeno às células T do sistema imunológico do indivíduo doente e dar início a uma resposta imunológica adaptativa (110,111). É afirmado pelos investigadores que as células neoplásicas stressadas pelo calor libertam exossomas que contêm antígenos e citocinas (112,113) e,

por isso, não só providenciam uma fonte de antigénio para as APCs, como também ajudam no processo de recrutamento de APCs e células T para os tumores.

Adicionalmente, é postulado que o calor altera a visibilidade dos tumores para as células imunológicas. É descrito que células aquecidas a 39,5 ou 43 °C expressam níveis de MICA, um ligando NKG2D, (114) ou MHC de classe I (115) mais altos, respetivamente, tornando os tumores mais sensíveis à lise por células NK ou CD8⁺, respetivamente. Finalmente é observado um aumento da permeabilidade vascular tumoral como consequência da hipertermia local a 42 °C (116), o que, por sua vez, melhora a perfusão no tumor e pode facilitar a circulação de células imunológicas entre tumores e órgãos linfáticos (103).

Desta forma, pode-se concluir que a técnica de fazer aumentar a temperatura num determinado local, recorrendo à administração e acumulação de nanopartículas de óxido de ferro em determinado tecido e posteriormente aumentar a energia cinética pela aplicação de um campo magnético alternante externo, que se traduzirá num aumento da energia térmica, permite fazer com que as nanopartículas desempenhem dois tipos de terapia. Uma das terapias envolve o aquecimento no local restrito de forma a que a morte celular das células cancerígenas seja desencadeada sem que haja repercussões para as células vizinhas saudáveis. A outra terapia envolve um processo mais complexo, sendo que o aumento de temperatura (inferior à anterior) leva a um desencadear de resposta imune pelo organismo, resposta esta específica para o local onde foi desencadeada.

3.2. Outras aplicações em terapêutica tumoral

Além da potencialidade da aplicação das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro em hipertermia, existem outras potenciais aplicações que incluem os exemplos apresentados a seguir.

Uma destas aplicações é a possibilidade de funcionalizar a sua superfície e dirigi-las para os tumores, abrindo assim um novo leque de possibilidades terapêuticas. O objetivo é que que sirvam de recetores a fármacos utilizados em quimioterapia ou que a própria estrutura da nanopartícula funcione como cápsula de transporte do fármaco, para que, quando chegar ao alvo e for absorvida pelo tumor, liberte o fármaco. Isto melhora significativamente a entrega de fármacos e a biodisponibilidade, quer do fármaco, quer das nanopartículas (117–119).

3.2.1. Imagiologia

A terapêutica anti tumoral utilizando nanopartículas de óxido de ferro pressupõe um conhecimento do tumor, tanto em localização, como em dimensão, para que se possa elaborar uma forma de alcançá-lo e escolher de entre os diversos métodos clínicos para o tratamento.

Para tal é necessário recorrer à imagiologia do tumor e dos tecidos adjacentes, para que se consiga direcionar o fármaco para o local de ação de forma mais incisiva possível. Um dos tipos de imagiologia utilizados, envolvendo as nanopartículas de óxido de ferro, é a imagiologia por ressonância magnética nuclear. Esta aplicabilidade baseia-se na capacidade de direcionar as nanopartículas para determinadas áreas em específico e fazê-las ficarem retidas aí, mas não só.

Huang et al. (118) descrevem as principais características das nanopartículas como agentes de contraste para ressonância magnética nuclear como sendo a sua capacidade de serem fagocitadas para o interior das células além do sistema vascular, o potencial melhoramento da intensidade do contraste, a sensibilidade de responder a pequenas variações que ocorrem nas diversas doenças e a capacidade de serem utilizadas como biomarcadores (118).

É também de grande relevância para o método, a sua capacidade magnética intrínseca, uma vez que, como o próprio nome indica, a imagiologia por ressonância magnética nuclear, depende da capacidade de interação com campos magnéticos externos aplicados, por parte do agente de contraste utilizado.

Atualmente, de forma a melhorar a resolução da imagem obtida por ressonância magnética, são utilizados meios de contraste, sendo o gadolínio o mais utilizado pelas suas propriedades paramagnéticas. Contudo, são descritas reações anafiláticas a este composto e, como as nanopartículas de óxido de ferro apresentam uma boa biocompatibilidade e a capacidade de serem acumuladas no local de interesse de forma predominante, possibilitam um novo leque de escolhas enquanto métodos de contraste.

De forma a reduzir a toxicidade e os efeitos secundários ao máximo possível, Yang et al. (120) desenvolveram um tipo de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com proteínas e fragmentos de péptidos na sua superfície, o que permitiu que essas mesmas partículas fossem reconhecidas e internalizadas por células tumorais que tenham uma sobre expressão de um determinado recetor. Estes investigadores criaram, assim, uma nano-sonda para ressonância magnética com especificidade para os recetores da superfície da célula, através de um péptido recombinante de um fragmento terminal de um aminoácido (ATF) e com especificidade para o recetor de membrana celular ativador de plasminogénio tipo urocinase (uPAR) (120). Yang e colaboradores elaboraram uma experiência com ratos com cancro da mama. Nesta experiência tentaram aferir a utilidade e aplicabilidade das IONPs funcionalizadas com ATF (ATF-IONPs). Para tal, administraram por via intravenosa e postularam que estas se ligavam especificamente às células cancerígenas que expressam o uPAR e que de seguida se dava a internalização na célula através de endocitose mediada por recetores. Para obterem a confirmação de que as nanopartículas desenvolvidas se haviam acumulado no local desejado, marcaram as partículas com uma molécula corante, Cy5.5. Esta molécula permitiu que se utilizasse a técnica de fluorescência perto de infravermelho (NIRF) para concluir que efetivamente as moléculas criadas por Yang e os colaboradores tinham alcançado e se acumulado no interior do tumor. Com este estudo, este grupo de investigadores demonstrou que as IONPs funcionalizadas com ATF apresentam um enorme potencial na utilização como agentes de contraste com alta especificidade para a deteção de cancro em humanos por ressonância magnética molecular direcionada por recetores com sondas de nanopartículas magnéticas (120).

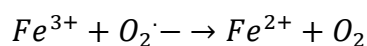
Assim, podemos concluir que as características das nanopartículas de óxido de ferro postas em prática no melhoramento da imagiologia por ressonância magnética justifica a sua utilização. A sua capacidade de serem fagocitadas para o interior das células cancerígenas de forma seletiva e guiada sem que tenham efeitos adversos nas células vizinhas e que apresentem uma maior segurança para o doente por terem uma boa biocompatibilidade são de facto características muito interessantes e que talvez façam das nanopartículas de óxido de ferro o composto escolhido em detrimento dos compostos utilizados atualmente. Estas características de nada serviam se a imagem obtida do procedimento não fosse melhorada de alguma forma e há uma clara melhoria na imagem obtida, facilitando todas as conclusões possíveis de retirar destes exames.

3.2.2. Melhoria da Radioterapia

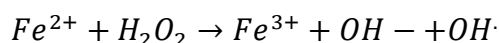
Em alternativa ou complementaridade a tratamentos farmacológicos (quimioterapia) existe a terapia por radiação (radioterapia). As nanopartículas de óxido de ferro têm, também, uma aplicabilidade nesta área, no que toca à melhoria da eficácia da radioterapia.

Hauser et al. (121) desenvolveram um estudo sobre a aplicação das nanopartículas de óxido de ferro no aumento da eficácia da radioterapia e postularam que, de forma a que se verifique este aumento de eficácia, estas nanopartículas podem ser utilizadas pela sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigénio (ROS) (121–123). Este grupo de investigadores justifica o benefício da utilização destas nanopartículas tendo, inicialmente em consideração de como a radioterapia desempenha a sua função, para que depois se possa justificar a implementação das nanopartículas no processo. Explicam então que a radiação promove a libertação de eletrões da cadeia de transporte de eletrões e leva a um aumento da produção mitocondrial de aniões superóxido, que são convertidos a peróxido de hidrogénio pela superóxido dismutase.

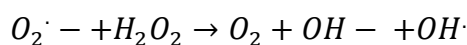
É postulado que as nanopartículas de óxido de ferro podem interagir com o processo neste passo, através da catalisação da reação de Haber-Weiss, onde ocorre a transformação de peróxido de hidrogénio para o radical hidroxilo altamente reativo, como é descrito nas reações abaixo, onde a Equação 3 corresponde à reação química de Fenton e a Equação 4 corresponde à equação de Haber-Weiss:



Equação 3



Equação 4



Estas reações são termodinamicamente desfavoráveis em sistemas biológicos e por isso perceberam que era necessário um catalisador (124). Sob condições normais, apenas concentrações vestigiais de ferro existem fora dos reservatórios fisiológicos como a transferrina ou ferritina (121). As proteínas sequestram iões de ferro, de forma a que os iões circulem no organismo sempre ligados a uma molécula de transferrina e se acumulem no interior das células sob a forma de ferritina. A absorção de ferro é regulada, em última instância, para prevenir um armazenamento em excesso e um ataque oxidativo (125).

As nanopartículas de óxido de ferro têm sido estudadas pelas suas diversas aplicabilidades biológicas e estudos mais recentes sugerem que o *uptake* celular das nanopartículas pode levar a um aumento da concentração intracelular de ferro livre que pode resultar em danificação celular ou até a sua morte (117,126,127), especialmente quando combinadas com outras terapias (117,122,128,129). Quando as IONPs alcançam o interior das células estimulam a geração de ROS através de um de dois processos: a libertação de iões para o citosol onde a quelação por citrato ou fosfato de adenosina toma lugar, resultando na inclusão dos iões de ferro no ciclo de Haber-Weiss, ou a superfície da nanopartícula de óxido de ferro pode atuar como catalisador para o ciclo de Haber-Weiss e a reação de Fenton (117,130–132). As duas vias dão origem ao hidroxilo, um radical altamente reativo.

Apesar de existirem várias vias das quais o ROS é gerado naturalmente, aquela que toma um interesse particular é respiração mitocondrial que produz aniões superóxido (124). Este anião é passivo de ser convertido a peróxido de hidrogénio através da superóxido dismutase natural e, na presença de iões ferro, esta conversão do peróxido para o hidroxilo altamente reativo, é catalisada (123). Ainda não é claro como o processo decorre, mas acredita-se que a radiação promove a respiração mitocondrial e, consequentemente, aumenta a produção de anião superóxido (133). As mitocôndrias também produzem ROS em excesso através da libertação de eletrões a partir da cadeia de transporte de eletrões (134). Acredita-se que a toxicidade resultante do aumento da

concentração do radical hidroxilo pode advir de um aumento da concentração intracelular de anião superóxido, de nanopartículas de óxido de ferro e da subsequente radiação.

As nanopartículas de óxido de ferro normalmente sofrem endocitose celular resultando em endossomas/lipossomas que encapsulam as nanopartículas. Como estes compartimentos sub-celulares têm um pH ácido, as nanopartículas muitas vezes não alcançam o seu propósito pelo que são degradadas. Contudo, este acontecimento pode ser evitado, em certo ponto, se a superfície das nanopartículas for funcionalizada. Tal feito pode ser alcançado de diversas formas, no caso em estudo, os investigadores propõem a funcionalização por meio de conjugação superficial de um péptido penetrador da célula (CPP), mais especificamente o péptido TAT, que resulta na evasão das nanopartículas do processo de endocitose (135). Além de evitar a endocitose, este péptido revela um grande interesse pela capacidade de se ligar à importina α e β no citoplasma, permitindo o transporte ativo das nanopartículas até ao complexo poroso nuclear (NPC) e, se estas nanopartículas forem pequenas o suficiente, até ao núcleo, como comprovados por diversos estudos (71,72,76,136,137).

Neste estudo, Hauser et al. (121) revestiram as nanopartículas de óxido de ferro, já funcionalizadas com o péptido TAT, com dextrano e foi este complexo que foi utilizado para melhorar a eficácia da radiação. A microscopia eletrónica foi utilizada para comparar os locais de concentração das nanopartículas com as diferentes etapas de funcionalização em células de cultura *in vitro*.

De forma a aferir a capacidade do péptido TAT desestabilizar os lisossomas e a perda de integridade mitocondrial pelas células, levando as mesmas a funcionar a um nível metabólico mais baixo, após sofrerem radiação combinada com nanopartículas funcionalizadas com o péptido TAT, foram conduzidos estudos de permeabilidade membranar lisossomal e estudos de respiração celular, respetivamente. Sabe-se, como referido, que as espécies reativas de oxigénio desempenham um papel fulcral neste processo de redução metabólica e estes estudos comprovam que, quando combinadas com radiação, as nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com o péptido TAT aumentam a produção destas espécies reativas (121).

Assim, o objetivo geral do estudo realizado por Hauser et al. (121), foi utilizar as nanopartículas de óxido de ferro conjugadas com o péptido TAT que facilita a penetração das nanopartículas nas células, de forma a produzir espécies reativas de oxigénio. Estas

ROS, quando conjugadas com a radiação incidente no tumor, influenciam diretamente os níveis metabólicos das mitocôndrias das células cancerígenas, resultando num deficiente funcionamento celular. Este funcionamento deficiente impede um desenvolvimento tumoral, como foi comprovado pela análise de um carcinoma pulmonar A549 que apresentou uma viabilidade de longo prazo.

Em suma, a utilização de nanopartículas de óxido de ferro no melhoramento dos tratamentos de radioterapia demonstra ser um grande avanço na área da oncologia. Por permitir uma acumulação das nanopartículas no tumor por funcionalização da superfície e assim garantir uma incidência dos raios de forma mais incisiva e isto permite reduzir os efeitos adversos que se fazem sentir nas células vizinhas às células cancerígenas. Após desempenharem o seu papel as nanopartículas de óxido de ferro são excretadas do organismo ou incorporadas no ferro do organismo.

3.2.3. Entrega de fármacos

A entrega de fármacos consiste na utilização de diferentes estratégias, formulações, tecnologias e sistemas para transportar um composto químico, desde o local de administração até ao local de ação, para que este possa exercer um efeito farmacológico. Esta abordagem é tanto mais eficaz quanto menos fármaco se perca entre o local de administração e o local de ação, porque isto traduz-se numa menor quantidade de fármaco que é necessário administrar e conseqüentemente menos efeitos secundários e/ou adversos podem surgir.

É uma estratégia com alguma importância no âmbito das nanopartículas magnéticas uma vez que estas permitem um direcionamento ativo até ao local alvo e, por permitirem a funcionalização da superfície, consegue-se com que não reajam com nenhum constituinte do soro até que cheguem ao tecido alvo.

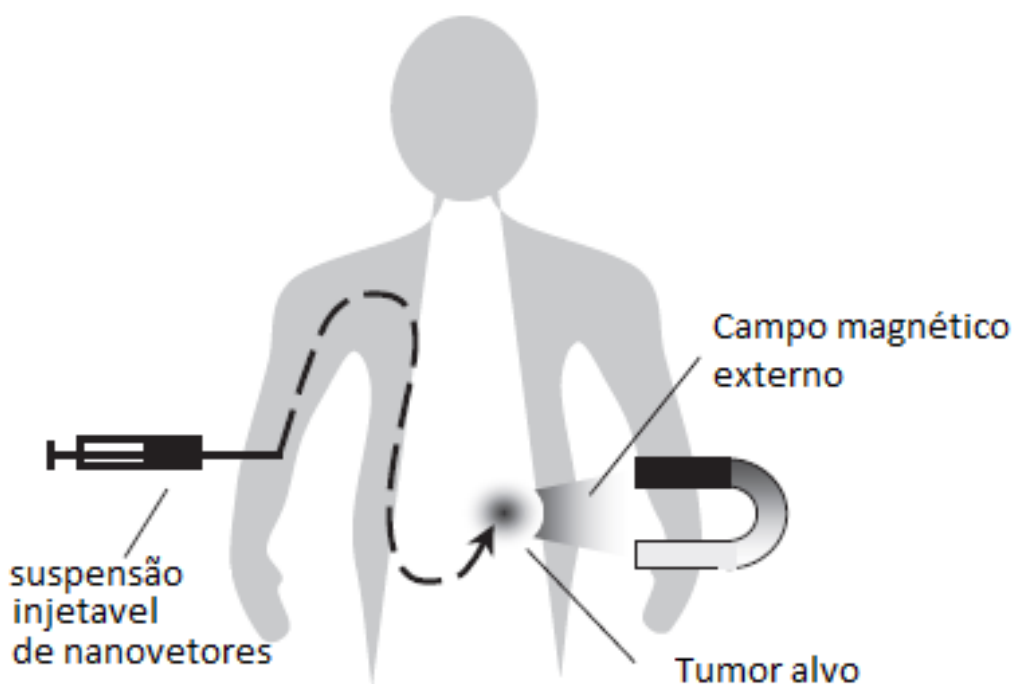


Figura 3.4 - Esquema do princípio teórico do direcionamento de fármacos (138).

Estelrich et al. (139) recordam Freeman et al. (140) como sendo o pioneiro por detrás da grande descoberta que foram as nanopartículas de óxido de ferro poderem ser transportadas pelo sistema circulatório de um organismo e acumularem-se em determinado tecido ou órgão que esteja afetado por uma doença, através da aplicação de um campo magnético externo. Estas nanopartículas podiam assim servir de vetores para compostos inorgânicos, como fármacos, ou orgânicos, como anticorpos, para o tratamento dessa patologia. Estelrich e os seus colaboradores reduziram a três pontos todo o processo que envolve o direcionamento de fármacos por meio de magnetismo: (i) necessidade de imobilizar o fármaco na nanopartícula magnética; (ii) administrar o complexo resultante do passo anterior num indivíduo, quer seja por via intravenosa ou por via intra-arterial; (iii) fazer esse complexo acumular-se numa determinada zona por recurso à aplicação de um campo magnético externo. É descrito também como é que a deposição do fármaco, depois de chegar ao alvo, ocorre. Este grupo de investigadores afirma haver apenas duas formas disto ocorrer, que será por ação enzimática ou por alterações fisiológicas no local, tais como alteração de pH, temperatura ou osmolaridade (139). Ainda que seja possível acumular as nanopartículas em determinado local com a aplicação de um campo magnético, a intensidade deste campo varia de acordo com os parâmetros fisiológicos do indivíduo, como o peso corporal, volume de sangue, *output* cardíaco, resistência periférica do sistema circulatório e estado de função dos órgãos.

Voltairas et al. (141) e Ruuge et al. (142) definem um intervalo de intensidade no qual o campo magnético deve ser mantido. Afirmam que para a maioria dos transportadores magnéticos, a intensidade do campo no alvo terapêutico deve ser mantida na ordem dos 200-700 mT com gradientes ao longo do eixo Z aproximadamente 8-100 T/m (141,142). Foram desenvolvidos estudos para avaliar não só as diferenças provocadas pela variação da intensidade do campo magnético, mas também para aferir em que zonas existe uma maior eficácia. Chegou-se à conclusão de que esta técnica é mais eficaz em zonas superficiais e onde o fluxo sanguíneo é mais lento (143).

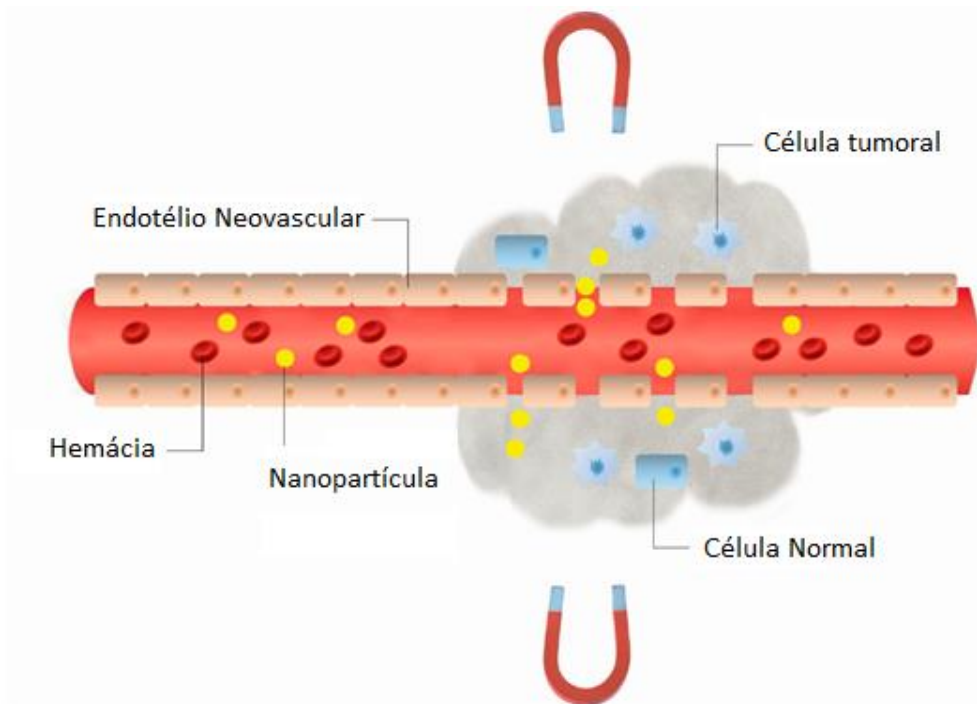


Figura 3.5 - Representação esquemática do método de direção-magnética de fármaco. As nanopartículas extravasam dos poros de uma parede de um vaso sanguíneo de tumor. (i.e. efeito de aumento da permeabilidade e retenção (EPR)) (144).

Estão a ser desenvolvidas formas de contornar as dificuldades referidas acima, tais como aumentar a eficácia do método mesmo quando o órgão alvo não é superficial ou quando os parâmetros fisiológicos do indivíduo dificultam a passagem do campo magnético, através da criação de novos dispositivos criadores de campos magnéticos. Como até então os dispositivos geradores de campo magnético seriam sempre um material externo ao organismo, como se pode ver na Figura 3.6, e que, desta forma, se aplicaria o campo magnético a uma distância mínima, Estelrich et al. (139) referem uma inovação nos dispositivos que aplicam o campo magnético no sentido de diminuir a distância entre o alvo e o campo, como por exemplo agulhas magnéticas, malhas e gaze - com propriedades magnéticas.

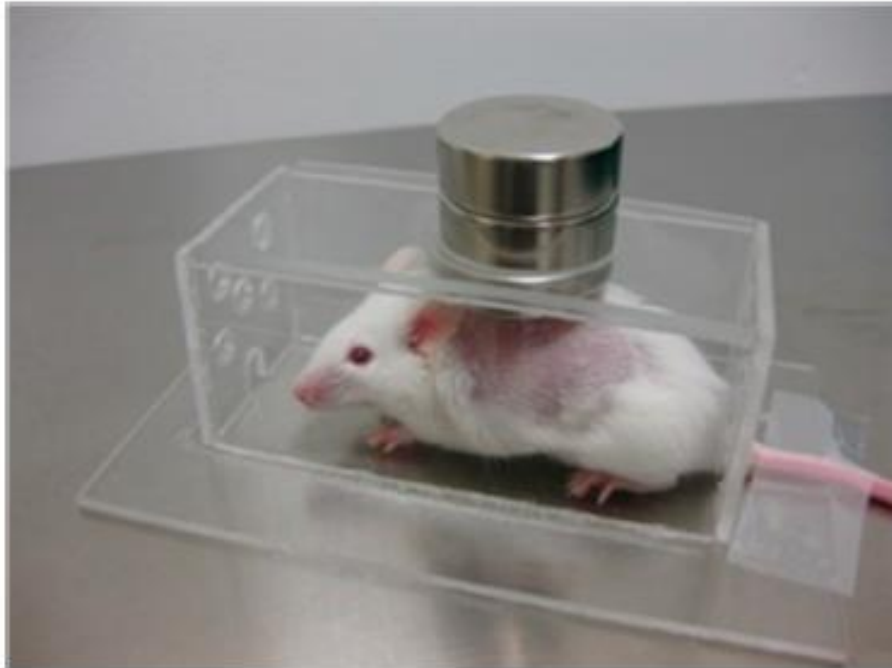


Figura 3.6 - Dispositivo experimental para determinar o efeito de um campo magnético externo na biodistribuição de nanopartículas magnéticas após injeção intravenosa no rato, no qual o foco inflamatório havia sido induzido nas costas (139).

A funcionalização das nanopartículas de óxido de ferro assume particular relevância quando o objetivo é a entrega de fármacos usando estes materiais como suportes. A escolha dos grupos funcionais deve ter em conta não só o tipo de fármaco a transportar, mas também a quantidade e a proteção dada ao próprio fármaco e, não menos importante, a forma como é libertado no tecido alvo.

Após se conseguir obter uma concentração ótima no local de ação de complexo de nanopartículas-fármaco é necessário que se consiga fazer com que o fármaco se desacople da superfície da nanopartícula. Existem algumas formas de o fazer, porém Estelrich et al. (139) fazem uma abordagem pela via magnética. Este grupo de investigadores refere que o primeiro grupo de investigação a desenvolver, com sucesso, este procedimento foi Kost et al. (145) onde observaram a libertação externamente controlada de insulina, que estava ligada a um composto magnético, pela aplicação de um campo magnético alternante de baixa frequência. Como referido no subcapítulo da hipertermia, a aplicação de um campo magnético alternante sob as nanopartículas de óxido de ferro, leva a um aumento da temperatura por consequência de aumento da energia cinética, e este fator pode ser utilizado como um “controlo remoto” externo no controlo da libertação do fármaco. A

energia é uma das formas de controlar a abertura dos poros de qualquer transportador, orgânico ou inorgânico, para permitir a passagem dos fármacos para a terapia, segundo Estelrich et al. (139).

Douziech-Eyrolles et al. (138) estudaram as capacidades e dificuldades de tornar as nanopartículas de óxido de ferro em vetores de transporte de fármacos até ao local do tumor. Estes investigadores consideraram a concentração que é possível carregar nas partículas capaz de desempenhar uma ação terapêutica com um volume de administração aceitável. Considerou-se também a importância da associação do fármaco com o vetor de forma reversível para que não existam consequências na atividade biológica do agente terapêutico. Por último, os investigadores referem que é de grande relevância ter em conta os perfis de libertação do fármaco do vetor, de forma a que desempenhem uma duração de tratamento razoável (138).

Os autores do estudo referem que pode ser utilizada uma matriz polimérica para a encapsulação dos fármacos e nanopartículas de óxido de ferro, mas esta abordagem implica uma degradação do polímero ou uma alteração na sua conformação para que o seu conteúdo seja libertado, permitindo assim uma entrega do fármaco e ao mesmo tempo uma direcionalização pela presença das nanopartículas. Porém, esta abordagem só é considerada quando há necessidade de proteger o organismo do contacto com o fármaco, desde o local de administração até ao local de ação.

Utilizado mais amplamente é o método de ligação química do fármaco diretamente à superfície das nanopartículas de óxido de ferro ou aos polímeros fixados na mesma. Esta abordagem foi desenvolvida para preservar a condição do fármaco até que alcance o local alvo e melhorar a biodistribuição, prolongando assim a sua atividade farmacológica (138).

Jafari et al. (146) levaram a técnica da entrega de fármacos recorrendo a nanopartículas de ferro, mais além, numa tentativa de entregar dois fármacos num tumor alvo com a utilização de uma só solução de nanovetores. No estudo desenvolvido por estes investigadores foram utilizadas nanopartículas de poliuretano (PU). Este material foi escolhido pela sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, permitindo assim a sua utilização para fins biomédicos como a entrega de fármacos. As nanopartículas de PU possibilitam a libertação controlada do fármaco pela variação do pH e/ou temperatura (5).

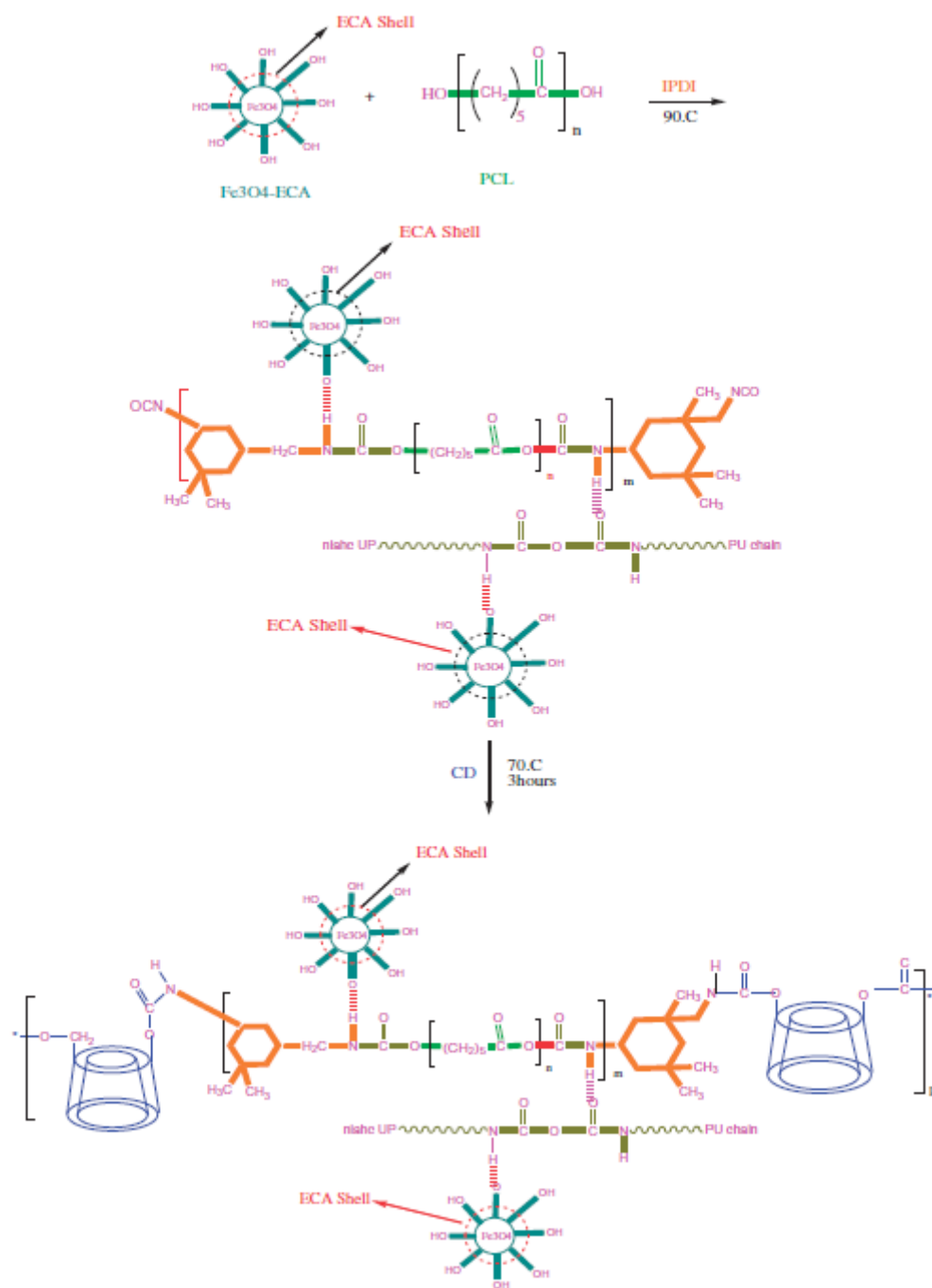


Figura 3.7 - Esquema dos passos de síntese do nanocomposto magnético baseado em ciclodextrina - poliuretano

Assim, os investigadores tentaram combinar dois fármacos num suporte desenvolvido por eles, com um conceito diferente. Este conceito baseia-se na característica anfifílica dos fármacos anticancerígenos e na utilização do potencial magnético das nanopartículas de óxido de ferro, nas características referidas acima do PU e no potencial de carregar duas moléculas de fármaco diferentes num mesmo suporte (147,148). Desta forma,

conjugaram os benefícios da ciclodextrina (CD) e da doxorubicina (DOX) numa só administração de solução injetável contendo este suporte. Os investigadores conseguiram guiar as nanopartículas para o local alvo através da aplicação de um campo magnético externo e fazer com que os grupos funcionais na superfície das partículas libertassem de forma controlada os fármacos pela alteração de pH no local (146).

Foram conduzidos estudos *in-vitro* para aferir a eficácia da libertação dos fármacos e concluíram que os resultados foram significativamente superiores aos previamente conduzidos, onde só se carregava os transportadores com DOX. Para a verificação da eficácia de todo o sistema de entrega de fármacos, biocompatibilidade e toxicidade foram feitos estudos com o nanocomposto através do acompanhamento da sobrevivência da linha de células do cancro mamário (146).

Ziarani et al. (149) procuraram estudar o papel desempenhado por um tipo diferente de nanopartículas magnéticas, as nanopartículas magnéticas com um núcleo “desimpedido” capaz de transportar moléculas, ou seja, nanopartículas ocas (150,151). Este grupo afirma que estas partículas, por não apresentarem um núcleo, têm uma densidade menor do que as até agora faladas e também uma área de superfície maior, melhorando as capacidades enquanto transportadores de fármacos e também a sua biodisponibilidade. Outra característica que torna estas partículas tão interessantes é a dimensão dos seus poros. Estas nano estruturas ocas têm poros grandes e isto permite incorporar vários fármacos e biomoléculas que podem ser libertados de forma controlada (152). À semelhança das nanopartículas magnéticas referidas ao longo de todo o trabalho, estas podem também sofrer uma funcionalização da superfície, tornando-as passíveis de serem especializadas para determinados procedimentos (149).

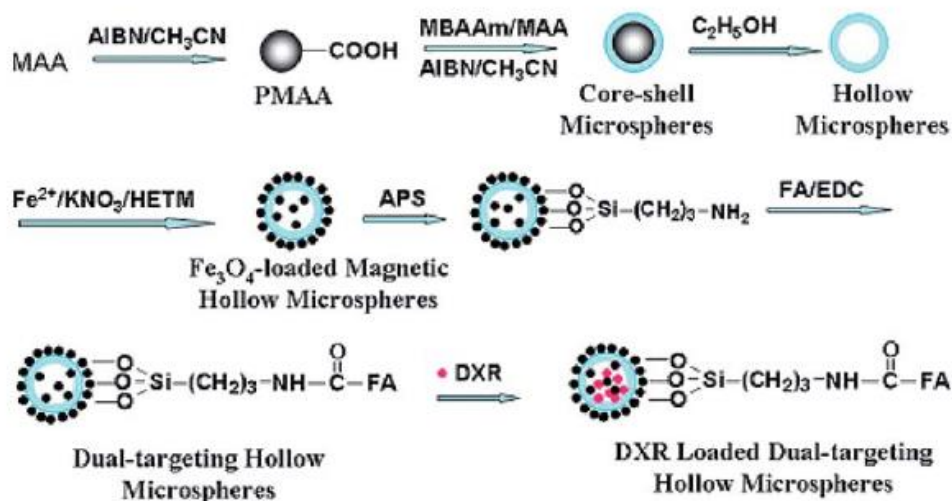


Figura 3.8 - Sequência de passos da preparação de microesferas ocas de magnetite de direcionamento tumoral como transportadores de fármacos anticancerígenos (149).

No que diz respeito à utilização destas nano estruturas no diagnóstico e terapêutica oncológica, Xu et al. (153) sintetizaram nanopartículas magnéticas onde no seu interior foi incorporada DOX, como se pode observar na Figura 3.8. Estudos *in vitro* foram conduzidos de forma a aferir a controlabilidade da libertação do fármaco. Assim, foi utilizada a via de libertação controlada por pH, onde 83% de DOX foi libertada em ambientes acídicos (pH 4,0 e 5,0), enquanto que em ambientes neutros (pH 7,4) apenas 18% do fármaco foi libertado em 48 h, indicando assim que a libertação prematura do fármaco é mínima, comprovando haver um controlo sobre a quantidade de fármaco libertada que depende das condições do ambiente a que estas são expostas e mantidas.

De acordo com o descrito acima, podemos verificar que existem várias características das nanopartículas que permitem várias formas de funcionalizar estes materiais, de acordo com o método de aplicação em vista. Dependendo dos fatores críticos para o sucesso do método clínico que se pretende aplicar, podemos dar preferência a uma forma de entrega de fármacos utilizando um dos tipos de moléculas referidas, em detrimento de outros.

Conceitos inovadores, em que as nanopartículas magnéticas podem desempenhar um importante papel, serão a chave para o desenvolvimento de novos métodos de administração de fármacos, em que se antevê um aumento da eficácia aliada à redução de efeitos secundários, quer de fármacos em uso, quer de novos fármacos a desenvolver.

3.3. Efeito das dimensões das nanopartículas

Como já foi referido anteriormente, as dimensões das nanopartículas são uma característica de grande relevância na determinação do sucesso ou na falha da aplicabilidade das mesmas. O tamanho de uma determinada partícula pode definir a extensão do organismo é capaz de percorrer, atuando num raio mais próximo ou mais distante do local de aplicação; pode influenciar a possibilidade de agregar ligandos à sua superfície, pelas dimensões dos mesmos; pode obrigar à escolha de uma via de administração em detrimento de outra, sendo que, no que diz respeito à via, se pode variar as dimensões para interagir com o meio onde são administradas de formas diferentes; pode diferenciar entre uma partícula capaz de transportar fármacos e uma partícula utilizada exclusivamente pela sua potencialidade magnética, sendo que esta característica magnética é também influenciada pelo tamanho da partícula.

Gupta et al. (39) resumem a efetividade da aplicação das nanopartículas de óxido de ferro num procedimento magnético, dependente do seu tamanho, dizendo que as dimensões de uma partícula, dais quais se espera um bom comportamento face à interação com um campo magnético externo, devem estar entre os valores de 6 e 15 nanómetros. O tamanho de partícula crítico é o tamanho a partir do qual cada partícula terá um único domínio magnético e, que por isso são chamadas de partículas superparamagnéticas. Estas partículas apresentam uma resposta qualitativamente positiva na aplicação de um procedimento biomédico dependente da sua capacidade magnética intrínseca, pois não retêm um carácter magnético após remoção do campo magnético externo. Estas dimensões permitem que as partículas sofram uma eliminação sistémica rápida por clearance renal segundo Pratsinis et al. (154).

As dimensões das partículas influenciam também a sua captação celular pela alteração da carga de superfície. Para comprovar esta influência, He et al. (155) desenharam um estudo onde prepararam dois modelos de nanopartículas, um carregado positivamente e outro carregado negativamente. Estes modelos tiveram dimensões muito bem definidas entre 150 e 500 nm. Os investigadores observaram, numa administração *in vivo*, que as nanopartículas com carga superficial negativa e com dimensões de 150 nm tinham uma predisposição maior para se acumular no tumor do que as restantes. Estes investigadores observaram também que se os modelos preparados tivessem cargas positiva superior a

+35 mV ou negativa inferior a -40 mV, teriam uma maior facilidade em serem excretados por macrófagos, o que foi de encontro ao que Roser et al. demonstraram (156).

Ainda que existam várias menções e estudos no que diz respeito ao tamanho das nanopartículas de óxido de ferro influenciar as suas características intrínsecas, é verdade que as dimensões também afetam, como referido antes, a farmacocinética e a biodistribuição destas partículas no organismo.

Reddy et al. (3) afirmam haver uma grande relação entre a dimensão das partículas e a sua farmacocinética e biodistribuição quando a via de administração é a intravenosa, como se pode observar na Figura 3.9. Sabe-se que quando as nanopartículas são administradas por esta via, existe uma resposta do meio, sendo esta a adesão de proteínas plasmáticas (opsoninas) à superfície das partículas. Esta adesão leva ao reconhecimento por macrófagos e, conseqüentemente, a clearance sistémica. Contudo, estes investigadores afirmam haver uma correlação entre a percentagem de opsoninas que ficam aderidas à superfície e a dimensão das nanopartículas. Foi demonstrado por Fang et al. que para NPs com um tamanho de 80 nm, a percentagem de opsoninas que sofrem adesão é de cerca de 6%, ao passo que em nanopartículas de dimensões superiores, como 171 e 240 nm, observam-se percentagens a rondar os 25% e 35%, respetivamente (157).

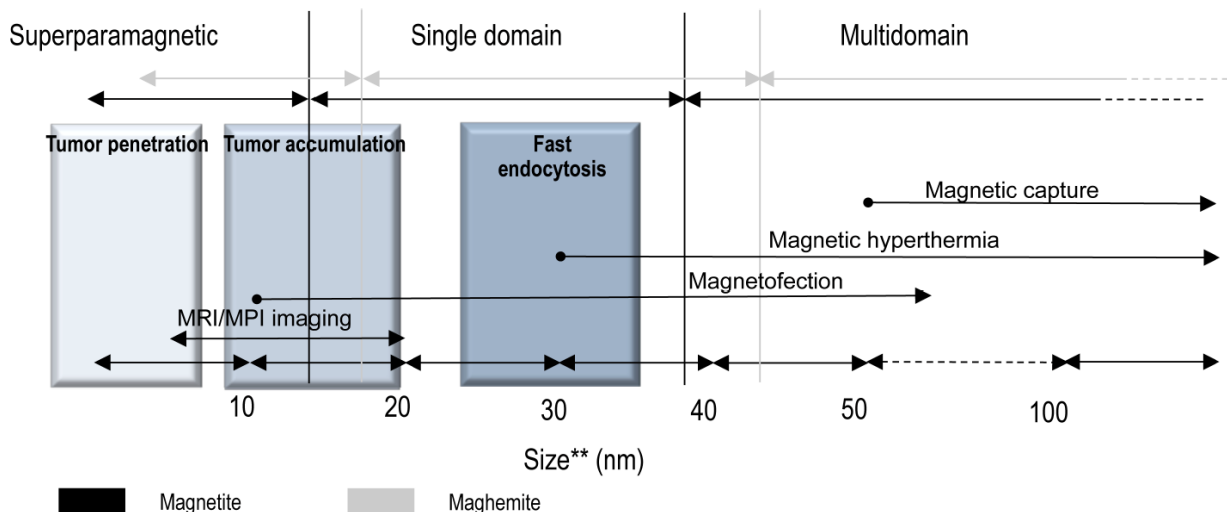


Figura 3.9 - Representação esquemática dos regimes magnéticos teóricos para a magnetite e maghemite, de acordo com algumas aplicações mais relevantes em função do tamanho de partícula.

Mais é dito sobre esta característica das NPs, que para partículas com dimensões superiores a 200 nm, é observada uma filtração no baço, resultando numa acumulação nesse órgão, enquanto que para partículas com tamanhos inferiores a 50-100 nm, têm uma maior probabilidade de ficarem retidas no parênquima hepático. Apesar de partículas com dimensões superiores a 1000 nm já saírem do âmbito das “nanopartículas”, por já se considerar uma micropartícula, é importante notar que, para partículas com mais de 4 micrómetros observa-se uma captação e retenção pulmonar, o que eleva o risco de ocorrer uma embolia (158,159).

Se se tomar o exemplo das nanopartículas de óxido de ferro revestidas por dextrano, o Ferumóxido, com diâmetro compreendido entre 80-150 nm, e o Ferumoxtrano-10, com diâmetro compreendido entre 20 e 40 nm, podemos contemplar uma clearance sistémica muito mais rápida no Ferumóxido, com cerca de 8 a 30 minutos de tempo de semi-vida, quando comparada com a do Ferumoxtrano-10, com um tempo de semi-vida de cerca de 25 a 30 h. Foi possível observar uma acumulação no fígado de Ferumóxido superior à do Ferumoxtrano-10, com valores superiores a 80% da quantidade total injetada 24h depois. Contudo, o Ferumoxtrano-10 apresentou uma acumulação superior à do Ferumóxido nos nódulos linfáticos com valores próximos de 20% da dose total injetada (160–162).

Um grupo de investigadores, Chouly et al. (163), conduziu uma experiência para analisar a biodistribuição das IONPs revestidas com dextrano e, para tal, administraram lotes destas partículas com diferentes dimensões, de forma a observarem a influência do diâmetro das partículas. Os resultados obtidos permitiram concluir que o tempo de semi-vida das NPs é inversamente proporcional à dimensão das partículas, enquanto que a captação hepática é diretamente proporcional à mesma característica. Os investigadores fizeram a administração intravenosa das IONPs e fizeram medições quantitativas do volume captado a nível hepático, em relação ao volume total administrado, dos diferentes lotes 20 min depois da injeção. Esta medição permitiu observar uma acumulação de partículas com dimensões de cerca de 30 nm de diâmetro de 22% da dose injetada e para as IONPs com diâmetro de cerca de 100 nm, observaram uma acumulação de 42%. Os autores do estudo justificaram este acontecimento pelo maior volume de opsoninas que sofre adesão à superfície das NPs levando a uma fagocitose em maior escala e um maior sequestro de partículas de maiores dimensões pelos macrófagos hepáticos. Iannone et al. (164) realizaram um estudo similar, com o mesmo tipo de NPs, mas com diferentes diâmetros, sendo estes de 40 e 200 nm. Este grupo de investigadores garantiu as

dimensões propostas através da medição por espectroscopia de ressonância do spin de elétrons. Como esperado, alcançou os mesmos resultados que Chouly et al. (163) quando conclui que as partículas de 200 nm sofrem uma rápida clearance sistêmica e as de 40 nm uma clearance mais lenta, demonstrando, claramente, uma relação entre o diâmetro das nanopartículas e a sua biodistribuição (3).

Assim, pode-se concluir, que as dimensões das nanopartículas utilizadas em qualquer método irá traduzir-se numa alteração da sua farmacocinética, tal como na sua capacidade para servir de ponto de ancoragem para materiais orgânicos e inorgânicos. A capacidade das nanopartículas de penetrarem os vasos sanguíneos e até as células dos tecidos alvo, está também diretamente relacionada com as dimensões das partículas. A distribuição de tamanho influencia ainda a forma como as partículas são incorporadas nas células e até mesmo se isto chega realmente a acontecer. As partículas podem ter uma dimensão que a endocitose seja impossibilitada ou até que os recetores na superfície das células sejam incapazes de as adsorver. É também relevante notar que o tamanho da partícula influencia de forma direta as suas propriedades magnéticas, sendo que, de acordo com o método no qual se pretende utilizar as nanopartículas de óxido de ferro, é necessário considerar as repercussões nas interações com as moléculas do sistema circulatório, desde o local alvo até ocorrer a excreção.

4. Conclusão

Com o avançar das investigações envolvendo as nanopartículas de óxido de ferro, gera-se um consenso na comunidade científica de que estas partículas têm, não só uma grande utilidade, como também uma grande versatilidade no que diz respeito à sua aplicabilidade em métodos de diagnóstico e tratamento médicos.

A extensão da literatura científica no âmbito das aplicações médicas das nanopartículas magnéticas é vasta e, desta forma, vimo-nos obrigados a fazer uma seleção de entre todos os artigos disponíveis para a utilização enquanto bibliografia desta monografia. Ainda que existam outras importantes aplicações das nanopartículas magnéticas, como a imagiologia e radiologia, foi do nosso interesse focar a atenção nas aplicações terapêuticas destes materiais. Contudo não deixamos de referir essas aplicações, contudo de forma breve. Após uma caracterização básica e geral das nanopartículas de óxido de ferro, foi feita uma seleção de exemplos que se achou serem descritivos das vantagens da utilização deste tipo de nanopartículas.

É possível concluir que as esferas de óxido de ferro com dimensões nanométricas, demonstram ser um promissor acréscimo aos métodos utilizados até agora na terapia de doenças neoplásicas. A característica diferenciadora das nanopartículas de óxido de ferro, em relação aos fármacos convencionais disponíveis até à data, é a capacidade de direcionabilidade. Enquanto que a quimioterapia e a radioterapia utilizadas nos dias de hoje apresentam uma especificidade para os tecidos alvo muito reduzida, com efeitos secundários muito presentes nos doentes que as praticam, as nanopartículas aqui estudadas, são direcionadas e acumuladas no local de interesse e, após desempenharem o seu papel, quer de entrega de fármacos, quer de destruição do tecido por hipertermia ou melhoramento da incidência da radiação, são incorporadas no ferro do organismo ou excretadas do organismo sem causarem danos ou interações com moléculas do sistema circulatório durante todo o percurso.

Diferentes fármacos podem necessitar de diferentes propriedades do suporte (que incorpora as nanopartículas de óxido de ferro), para que se possa garantir uma entrega do referido fármaco no local desejado sem que este sofra alterações físico-químicas que se traduzam numa redução da capacidade terapêutica. Existem diferentes formas de efetuar o transporte de um fármaco recorrendo a nanopartículas, como por exemplo, acoplado a

um material orgânico, que por sua vez esteja ancorado na superfície da nanopartícula ou mantido no núcleo de uma partícula de maiores dimensões, como por exemplo uma esfera de sílica mesoporosa, onde as nanopartículas de ferro atuam como “rolha” nos poros permitindo a libertação controlada do fármaco.

Os vários métodos de síntese permitem, a quem tiver interesse de desenvolver nanopartículas de óxido de ferro, controlar as características cruciais para o sucesso do método que se procura aplicar. Permitem ainda um controlo sobre fatores extrínsecos às partículas, mas que também têm um peso importante na escolha, sendo estes, por exemplo, o tempo necessário para a síntese e o custo desse mesmo procedimento. Quer se pretenda um método de síntese rápido, sem que haja preocupações com o custo do mesmo e onde só a distribuição de dimensão das nanopartículas importa, quer se necessite de características superficiais das partículas específicas a um custo acessível e o tempo de preparação não seja importante, existem métodos de síntese capazes de preencher estes requisitos.

Novas utilidades das nanopartículas continuam a ser descobertas e novos métodos de as incluir em métodos de terapêutica e diagnóstico, são propostos ano após ano. Com o aumento de doenças neoplásicas em humanos, gera-se também uma preocupação em relação aos tratamentos disponíveis, não só no que diz respeito aos custos envolvidos, mas principalmente no que se relaciona com os efeitos secundários e adversos sentidos pelos doentes nas técnicas de diagnóstico e terapêutica disponíveis atualmente. Assim, esperam-se no futuro avanços na utilização de nanopartículas de óxido de ferro na terapia e diagnóstico de cancro, de modo a aumentar a eficácia e a segurança de fármacos já em uso, bem como a incorporação em sistemas inovadores de entrega de novos fármacos.

Referências

1. Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim WS. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci Technol Adv Mater*. 2015;16(2):23501.
2. Teja AS, Koh PY. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog Cryst Growth Charact Mater*. 2009;55(1–2):22–45.
3. Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem Rev*. 2012;112(11):5818–78.
4. Świątek M, Lu Y-C, Konefał R, Ferreira LP, Cruz MM, Ma Y-H, et al. Scavenging of reactive oxygen species by phenolic compound-modified maghemite nanoparticles. *Beilstein J Nanotechnol*. 2019;10:1073–88.
5. Veisheh O, Gunn J, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. 2011;62(3):284–304.
6. Silva LHA, Cruz FF, Morales MM, Weiss DJ, Rocco PRM. Magnetic targeting as a strategy to enhance therapeutic effects of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):1–8.
7. Rai M, Ahmad V, Kamal M, Zafar Iqbal AN, Danish Rizvi S, Khan S, et al. Magnetic Nanoparticles: Properties, Synthesis and Biomedical Applications. *Curr Drug Metab*. 2015;16(8):685–704.
8. Fiejdasz S, Rybicki D, Goc K. Dynamics of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Polymeric Coatings.
9. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem Rev*. 2008;108(6):2064–110.
10. Schladt TD, Schneider K, Schild H, Tremel W. Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment. *Dalt Trans*. 2011;40(24):6315–43.
11. Kang YS, Risbud S, Rabolt JF, Stroeve P. Synthesis and Characterization of Nanometer-Size Fe₃O₄ and γ-Fe₂O₃ Particles. *Chem Mater*. 1996;8(9):2209–11.
12. McFee JE, Das Y. Determination of the Parameters of a Dipole. *IEEE Trans antennas Propag*. 1981;AP-29(2):282–7.
13. K. LaMer V, H. Dinegar R. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J Am Chem Soc*. 1 de Maio de 2002;72(11):4847–54.
14. Qu S, Yang H, Ren D, Kan S, Zou G, Li D, et al. Magnetite nanoparticles prepared by precipitation from partially reduced ferric chloride aqueous solutions. *J Colloid Interface Sci*. 1999;215(1):190–2.

15. Thomas G, Demoisson F, Chassagnon R, Popova E, Millot N. One-step continuous synthesis of functionalized magnetite nanoflowers. *Nanotechnology*. 2016;27(13):0.
16. Dubois T, Demazeau G. Preparation of Fe₃O₄ fine particles through a solvothermal process. *Mater Lett*. 1994;19(1–2):38–47.
17. Amstad E, Textor M, Reimhult E. Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale*. 2011;3(7):2819–43.
18. Sun X, Zheng C, Zhang F, Yang Y, Wu G, Yu A, et al. Size-controlled synthesis of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles coated with glucose and gluconic acid from a single Fe(III) precursor by a sucrose bifunctional hydrothermal method. *J Phys Chem C*. 2009;113(36):16002–8.
19. Si S, Kotal A, Mandal TK, Giri S, Nakamura H, Kohara T. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles in the presence of polyelectrolytes. *Chem Mater*. 2004;16(18):3489–96.
20. Liu X Di, Chen H, Liu SS, Ye LQ, Li YP. Hydrothermal synthesis of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles with ionic liquids as stabilizer. *Mater Res Bull*. 2015;62:217–21.
21. Hu F, Wei L, Zhou Z, Ran Y, Li Z, Gao M. Preparation of biocompatible magnetite nanocrystals for in vivo magnetic resonance detection of cancer. *Adv Mater*. 2006;18(19):2553–6.
22. Varma RS, Baruwati B, Nadagouda MN. Bulk Synthesis of Monodisperse Ferrite Nanoparticles at Water-Organic Interfaces under Conventional and Microwave Hydrothermal Treatment and Their Surface Functionalization. *J Phys Chem C*. 2008;112(47):18399–404.
23. Ge S, Shi X, Sun K, Li C, Uher C, Baker JR, et al. Facile Hydrothermal Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Tunable Magnetic Properties. *J Phys Chem C*. 2009;113(31):13593–9.
24. Tian Y, Yu B, Li X, Li K. Facile solvothermal synthesis of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals with precise size control of one nanometre as potential MRI contrast agents. *J Mater Chem*. 2011;21(8):2476.
25. Shen K, Wang J, Li Y, Wang Y, Li Y. Preparation of magnetite core-shell nanoparticles of Fe₃O₄ and carbon with aryl sulfonyl acetic acid. *Mater Res Bull*. 2013;48(11):4655–60.
26. Liang J, Yue A, Wang Q, Song S, Li L. Tailored synthesis of well-faceted single crystals of Fe₃O₄ and their application in p-nitrophenol reduction†. *RSC Adv*. 2016;6(35):29497–503.
27. Liu J, Qiao SZ, Hu QH, Lu GQ. Magnetic nanocomposites with mesoporous structures: Synthesis and applications. *Small*. 2011;7(4):425–43.
28. Park J, An K, Hwang Y, Park JEG, Noh HJ, Kim JY, et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat Mater*. 2004;3(12):891–5.

29. Li Y, Ma F, Su X, Sun C, Liu J, Sun Z, et al. Synthesis and catalysis of oleic acid-coated Fe₃O₄ nanocrystals for direct coal liquefaction. *Catal Commun.* 2012;26:231–4.
30. Patsula V, Kosinová L, Lovrić M, Ferhatovic Hamzić L, Rabyk M, Konefal R, et al. Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles: Synthesis by Thermal Decomposition of Iron(III) Glucuronate and Application in Magnetic Resonance Imaging. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(11):7238–47.
31. Sun S, Zeng H, Robinson DB, Raoux S, Rice PM, Shan X, Wang A, et al. Controlled Synthesis of MFe₂O₄ (M = Mn , Fe , Co , Ni and Zn) Nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2004;126(1):273–9.
32. Ravikumar C, Bandyopadhyaya R. Mechanistic study on magnetite nanoparticle formation by thermal decomposition and coprecipitation routes. *J Phys Chem C.* 2011;115(5):1380–7.
33. Belaïd S, Laurent S, Vermeech M, Elst L Vander, Perez-Morga D, Muller RN. A new approach to follow the formation of iron oxide nanoparticles synthesized by thermal decomposition. *Nanotechnology.* 2013;24(5).
34. Vuong TKO, Tran DL, Le TL, Pham DV, Pham HN, Ngo TH Le, et al. Synthesis of high-magnetization and monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles via thermal decomposition. *Mater Chem Phys.* 2015;163:537–44.
35. Amara D, Felner I, Nowik I, Margel S. Synthesis and characterization of Fe and Fe₃O₄ nanoparticles by thermal decomposition of triiron dodecacarbonyl. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2009;339(1–3):106–10.
36. Wetterskog E, Agthe M, Mayence A, Grins J, Wang D, Rana S, et al. Precise control over shape and size of iron oxide nanocrystals suitable for assembly into ordered particle arrays. *Sci Technol Adv Mater.* 2014;15(5).
37. Gutiérrez L, Costo R, Grüttner C, Westphal F, Gehrke N, Heinke D, et al. Synthesis methods to prepare single- and multi-core iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Dalt Trans.* 2015;44(7):2943–52.
38. Asuha S, Suyala B, Siqintana X, Zhao S. Direct synthesis of Fe₃O₄ nanopowder by thermal decomposition of Fe-urea complex and its properties. *J Alloys Compd.* 2011;509(6):2870–3.
39. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 2005;26(18):3995–4021.
40. Chen D, Wu S. Synthesis of nickel nanoparticles in water-in-oil microemulsions. *Chem Mater.* 1999;21(9):1354–60.
41. Lee Y, Lee J, Bae CJ, Park JG, Noh HJ, Park JH, et al. Large-scale synthesis of uniform and crystalline magnetite nanoparticles using reverse micelles as nanoreactors under reflux conditions. *Adv Funct Mater.* 2005;15(3):503–9.
42. Wang JY, Mu X, Li Y, Xu F, Long W, Yang J, et al. Hollow PtPdRh Nanocubes with Enhanced Catalytic Activities for In Vivo Clearance of Radiation-Induced ROS via Surface-Mediated Bond Breaking. *Small.* 2018;14(13):1–13.

43. Vidal-Vidal J, Rivas J, López-Quintela MA. Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2006;288(1–3):44–51.
44. Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander Elst L., et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chem Rev.* 2008;108(6):2064–110.
45. Raileanu M, Crisan M, Petrache C, Crisan D, Jitianu A, Zaharescu M, et al. Sol-gel Fe_xO_y - SiO₂ nanocomposites. *Rom J Phys.* 2005;50(5–6):595–606.
46. Hasanpour A, Niyafar M, Asan M, Amighian J. Synthesis and characterization of Fe₃O₄ and ZnO nanocomposites by the sol-gel method. *J Magn Magn Mater.* 2013;334:41–4.
47. Raileanu M, Crisan M, Petrache C, Crisan D, Zaharescu M. Fe₂O₃-SiO₂ nanocomposites obtained by different sol-gel routes. *J Optoelectron Adv Mater.* 2003;5(3):693–8.
48. Lemine OM, Omri K, Zhang B, El Mir L, Sajieddine M, Alyamani A, et al. Sol-gel synthesis of 8 nm magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and their magnetic properties. *Superlattices Microstruct.* 2012;52(4):793–9.
49. Sciancalepore C, Gualtieri AF, Scardi P, Flor A, Allia P, Tiberto P, et al. Structural characterization and functional correlation of Fe₃O₄ nanocrystals obtained using 2-ethyl-1,3-hexanediol as innovative reactive solvent in non-hydrolytic sol-gel synthesis. *Mater Chem Phys.* 2018;207:337–49.
50. Cai W, Wan J. Facile synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles in liquid polyols. *J Colloid Interface Sci.* 2007;305(2):366–70.
51. Vega-Chacón J, Picasso G, Avilés-Félix L, Jafelicci M. Influence of synthesis experimental parameters on the formation of magnetite nanoparticles prepared by polyol method. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol.* 2016;7(1).
52. Kubrakova I V., Koshcheeva IY, Pryazhnikov D V., Martynov LY, Kiseleva MS, Tyutyunnik OA. Microwave synthesis, properties and analytical possibilities of magnetite-based nanoscale sorption materials. *J Anal Chem.* 2014;69(4):336–46.
53. Abu Mukh-Qasem R, Gedanken A. Sonochemical synthesis of stable hydrosol of Fe₃O₄ nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 2005;284(2):489–94.
54. Wang N, Zhu L, Wang D, Wang M, Lin Z, Tang H. Sono-assisted preparation of highly-efficient peroxidase-like Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for catalytic removal of organic pollutants with H₂O₂. *Ultrason Sonochem.* 2010;17(3):526–33.
55. Rodríguez-López A, Paredes-Arroyo A, Mojica-Gomez J, Estrada-Arteaga C, Cruz-Rivera JJ, Elías Alfaro CG, et al. Electrochemical synthesis of magnetite and maghemite nanoparticles using dissymmetric potential pulses. *J Nanoparticle Res.* 2012;14(8).
56. Cabrera L, Gutierrez S, Menendez N, Morales MP, Herrasti P. Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. *Electrochim Acta.* 2008;53(8):3436–41.

57. Gallo J, Long NJ, Aboagye EO. Magnetic nanoparticles as contrast agents in the diagnosis and treatment of cancer. *Chem Soc Rev.* 2013;42(19):7816–33.
58. Tombácz E, Turcu R, Socoliuc V, Vékás L. Magnetic iron oxide nanoparticles: Recent trends in design and synthesis of magnetoresponsive nanosystems. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;468(3):442–53.
59. Qian ZM, LI H, SUN H, HO K. Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor- Mediated Endocytosis Pathway. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;41(2):147–62.
60. Moore A, Basilion JP, Chiocca EA, Weissleder R. Measuring transferrin receptor gene expression by NMR imaging. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 1998;1402(3):239–49.
61. Berry CC, Charles S, Wells S, Dalby MJ, Curtis ASG. The influence of transferrin stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture. *Int J Pharm.* 2004;269(1):211–25.
62. Moore A, Josephson L, Bhorade RM, Basilion JP, Weissleder R. Human Transferrin Receptor Gene as a Marker Gene for MR Imaging. *Hum Transf Recept Gene as a Marker Gene MR Imaging.* 2001;221(1):244.
63. Gupta AK, Curtis ASG. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials.* 2004;25(15):3029–40.
64. Lauffenburger DA, Linderman JJ. Receptors: models for binding, trafficking, and signaling. *J Control Release.* 1996;39(1):105–6.
65. Tanji N, Aoki K, Yokoyama M. Growth factors: Roles in andrology. *Arch Androl.* 2001;47(1):1–7.
66. Gupta AK, Berry C, Gupta M, Curtis A. Receptor-mediated targeting of magnetic nanoparticles using insulin as a surface ligand to prevent endocytosis. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2003;2(4):255–61.
67. Boyle MDP, Lawman MJP, Gee AP, Young M. Nerve growth factor : a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. 2019;
68. Kaneo Y, Tanaka T, Nakano T, Yamaguchi Y. Evidence for receptor-mediated hepatic uptake of pullulan in rats. *J Control Release.* 2001;70(3):365–73.
69. Debelle L, Tamburro AM. Elastin: Molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31(2):261–72.
70. Baker ME. Albumin's role in steroid hormone action and the origins of vertebrates: Is albumin an essential protein? *FEBS Lett.* 1998;439(1–2):9–12.
71. Josephson L, Tung CH, Moore A, Weissleder R. High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-tat peptide conjugates. *Bioconjug Chem.* 1999;10(2):186–91.
72. Lewin M, Carlesso N, Tung C, Tang X, Cory D, Scadden DT, et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery. 2000;18(March):410–4.

73. Bhadriraju K, Hansen LK. Hepatocyte adhesion, growth and differentiated function on RGD-containing proteins. *Biomaterials*. 2000;21(3):267–72.
74. José M, Pires M. Espectroscopia Mössbauer : da Física Nuclear à verificação de efeitos relativísticos. 8.
75. Cortajarena AL, Ortega D, Ocampo SM, Gonzalez-García A, Couleaud P, Miranda R, et al. Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings. *Nanobiomedicine*. 2014;1:2.
76. Austin, Lauren A.; Kang, Bin; Yen, Chun-Wan; El-Sayed MA. Nuclear Targeted Silver Nanospheres Perturb the Cancer Cell Cycle Differently than those of Nanogold. *HHS Public Access*. 2016;25(3):289–313.
77. Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett*. 2012;7(1):144.
78. Hyeon T, Su Seong Lee, Park J, Chung Y, Hyon Bin Na. Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *J Am Chem Soc*. 2001;123(51):12798–801.
79. Jana NR, Chen Y, Peng X. Size- and shape-controlled magnetic (Cr, Mn, Fe, Co, Ni) oxide nanocrystals via a simple and general approach. *Chem Mater*. 2004;16(20):3931–5.
80. Sun S, Murray CB, Weller D, Folks L, Moser A. ChemInform Abstract: Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices. *ChemInform*. 2010;31(27):no-no.
81. Chen M, Liu JP, Sun S. One-step synthesis of FePt nanoparticles with tunable size. *J Am Chem Soc*. 2004;126(27):8394–5.
82. Cabuil V. Magnetic Nanoparticles: Preparation and Properties. *Encycl Surf Colloid Sci Third Ed*. 2015;74(6):3934–48.
83. Rudin M, Weissleder R. Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(2):123–31.
84. Spaldin NA. MAGNETIC MATERIALS Fundamentals and Applications Magnetic. Vol. 111, *The British Journal of Psychiatry*. 1965. 1009–1010 p.
85. Gu H, Zheng R, Zhang XX, Xu B. Facile One-Pot Synthesis of Bifunctional Heterodimers of Nanoparticles: A Conjugate of Quantum Dot and Magnetic Nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2004;126(18):5664–5.
86. Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: Preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett*. 2012;7(1):144.
87. Ha Y, Ko S, Kim I, Huang Y, Mohanty K, Huh C, et al. Recent Advances Incorporating Superparamagnetic Nanoparticles into Immunoassays. *ACS Appl Nano Mater*. 2018;1(2):512–21.
88. Chang D, Lim M, Goos JACM, Qiao R, Ng YY, Mansfeld FM, et al. Biologically targeted magnetic hyperthermia: Potential and limitations. *Front Pharmacol*. 2018;9(AUG).

89. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncology*. 2002.
90. Dewey WC, Hopwood LE, Sapareto SA, Gerweck LE. Cellular Responses to Combinations of Hyperthermia and Radiation. *Radiology*. 2014;123(2):463–74.
91. Roizin-Towle L, Pirro JP. The response of human and rodent cells to hyperthermia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991;20(4):751–6.
92. van der Zee J. Heating the patient: A promising approach? *Ann Oncol*. 2002;13(8):1173–84.
93. Lepock JR, Borrelli MJ. How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperth*. 2005;21(8):681–7.
94. Borrelli MJ, Lepock JR, Frey HE, Lee YJ, Corry PM. Excess protein in nuclei isolated from heat-shocked cells results from a reduced extractability of nuclear proteins. *J Cell Physiol*. 1996;167(3):369–79.
95. Kampinga HH, Dynlacht JR, Dikomey E. Mechanism of radiosensitization by hyperthermia ($\geq 43^{\circ}\text{C}$) as derived from studies with DNA repair defective mutant cell lines. *Int J Hyperth*. 2004;20(2):131–9.
96. Leonel MS. Susceptibilidade magnética ac de nanopartículas para utilização em hipertermia magnética. *IOSR J Econ Financ*. 2016;3(1):56.
97. Le Fèvre R, Durand-Dubief M, Chebbi I, Mandawala C, Lagroix F, Valet JP, et al. Enhanced antitumor efficacy of biocompatible magnetosomes for the magnetic hyperthermia treatment of glioblastoma. *Theranostics*. 2017;7(18):4618–31.
98. Matsunaga T, Suzuki T, Tanaka M, Arakaki A. Molecular analysis of magnetotactic bacteria and development of functional bacterial magnetic particles for nano-biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2007;25(4):182–8.
99. Araujo AC V., Abreu F, Silva KT, Bazylnski DA, Lins U. Magnetotactic bacteria as potential sources of bioproducts. Vol. 13, *Marine Drugs*. 2015. 389–430 p.
100. Orlando T, Mannucci S, Fantechi E, Conti G, Tambalo S, Busato A, et al. Characterization of magnetic nanoparticles from *Magnetospirillum Gryphiswaldense* as potential theranostics tools. *Contrast Media Mol Imaging*. 2016;11(2):139–45.
101. Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J Biosci Bioeng*. 2005;100(1):1–11.
102. Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2011;103(2):317–24.
103. Toraya-brown S, Ph D, Sheen MR, Zhang P, Chen L, Ph DVMD, et al. Local hyperthermia treatment of tumors induces CD8+ T cell- mediated resistance against distal and secondary tumors. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2015;10(6):1273–85.

104. Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. Immunology 8 th Edition. 2015. 482 p.
105. Strønen E, Toebes M, Kelderman S, Van Buuren MM, Yang W, Van Rooij N, et al. Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires. *Science* (80-). 2016;
106. Tecnologia RC e. Transplante de células T de outra pessoa vira arma contra o câncer. *Ciências e Tecnol.*
107. Binder RJ, Han DK, Srivastava PK. CD91: A receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol.* 2000;1(2):151–5.
108. Bethke K, Staib F, Distler M, Schmitt U, Jonuleit H, Enk AH, et al. Different Efficiency of Heat Shock Proteins (HSP) to Activate Human Monocytes and Dendritic Cells: Superiority of HSP60. *J Immunol.* 2002;169(11):6141–8.
109. Todryk S, Melcher AA, Hardwick N, Linardakis E, Bateman A, Stoppacciaro A, et al. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J Immunol.* 1999;163(3):1398–408.
110. Noessner E, Gastpar R, Milani V, Brandl A, Hutzler PJS, Kuppner MC, et al. Tumor-Derived Heat Shock Protein 70 Peptide Complexes Are Cross-Presented by Human Dendritic Cells. *J Immunol.* 2002;169(10):5424–32.
111. Suzue K, Zhou X, Eisen HN, Young RA. Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(24):13146–51.
112. Dai S, Wan T, Wang B, Zhou X, Xiu F, Chen T, et al. More efficient induction of HLA-A*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA) - Specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells. *Clin Cancer Res.* 2005;11(20):7554–63.
113. Chen T, Guo J, Yang M, Zhu X, Cao X. Chemokine-Containing Exosomes Are Released from Heat-Stressed Tumor Cells via Lipid Raft-Dependent Pathway and Act as Efficient Tumor Vaccine. *J Immunol.* 2011;186(4):2219–28.
114. Ostberg JR, Dayanc BE, Yuan M, Oflazoglu E, Repasky EA. Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity by fever-range thermal stress is dependent on NKG2D function and is associated with plasma membrane NKG2D clustering and increased expression of MICA on target cells. *J Leukoc Biol.* 2007;82(5):1322–31.
115. Ito A, Tanaka K, Kondo K, Shinkai M, Honda H, Matsumoto K, et al. Tumor regression by combined immunotherapy and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma. *Cancer Sci.* 2003;94(3):308–13.
116. Meyer RE, Braun RD, Rosner GL, Dewhirst MW. Local 42 degrees C hyperthermia improves vascular conductance of the R3230Ac rat mammary adenocarcinoma during sodium nitroprusside infusion. *Radiat Res.* Agosto de 2000;154(2):196–201.

117. Klein S, Sommer A, Distel LVR, Neuhuber W, Kryschi C. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;425(2):393–7.
118. Huang J, Zhong X, Wang L, Yang L, Mao H. Improving the magnetic resonance imaging contrast and detection methods with engineered magnetic nanoparticles. *Theranostics*. 2012;2(1):86–102.
119. Bu L, Xie J, Chen K, Huang J, Aguilar ZP, Wang A, et al. Assessment and comparison of magnetic nanoparticles as MRI contrast agents in a rodent model of human hepatocellular carcinoma. *NIH Public Access*. 2008;23(1):1–7.
120. Yang L, Mao H, Wang YA, Cao Z, Peng X, Xiaoxia W, et al. Single Chain Epidermal Growth Factor Receptor Antibody Conjugated Nanoparticles for in vivo Tumor Targeting and Imaging. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
121. Anastasia K. Hauser, Mihail I. Mitov, Emily F. Daley, Ronald C. McGarry, Kimberly W. Anderson and JZH. Targeted iron oxide nanoparticles for the enhancement of radiation therapy. *J Autism Dev Disord*. 2017;47(3):549–62.
122. Luo C, Li Y, Yang L, Wang X, Long J, Liu J. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles exacerbate the risks of reactive oxygen species-mediated external stresses. *Arch Toxicol*. Março de 2015;89(3):357–69.
123. Könczöl M, Weiss A, Stangenberg E, Gminski R, Garcia-Käufer M, Gieré R, et al. Cell-cycle changes and oxidative stress response to magnetite in A549 human lung cells. *Chem Res Toxicol*. 2013;26(5):693–702.
124. James P K. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;
125. Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother*. Julho de 2001;55(6):333–9.
126. Weissleder R, Engelstad B, Compton C, Lewis J, Stark D, White D, et al. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am J Roentgenol*. 2013;152(1):167–73.
127. Alarifi S, Ali D, Alkahtani S, Alhader MS. Iron oxide nanoparticles induce oxidative stress, DNA damage, and caspase activation in the human breast cancer cell line. *Biol Trace Elem Res*. 2014;159(1–3):416–24.
128. Huang G, Chen H, Dong Y, Luo X, Yu H, Moore Z, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Amplifying ROS stress to improve anticancer drug efficacy. *Theranostics*. 2013;3(2):116–26.
129. Klein S, Sommer A, Distel LVR, Hazemann JL, Kröner W, Neuhuber W, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as novel x-ray enhancer for low-dose radiation therapy. *J Phys Chem B*. 2014;118(23):6159–66.
130. Fukui K. The Path of Chemical Reactions - The IRC Approach. *Acc Chem Res*. 1981;
131. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*. 2008;4(1):26–49.

132. Auffan M, Rose J, Masion A, Bottero J-Y, Achouak W, Roncato M-A, et al. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*. *Environ Sci Technol*. 2008;42(17):6730–5.
133. Kam WWY, Banati RB. Effects of ionizing radiation on mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013.
134. Azzam, Edouard I.; Jay-Gerin, Jean-Paul; Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *NIH Public Access*. 2008;23(1):1–7.
135. Vivès E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*. 1997;272(25):16010–7.
136. Wang C, Qiao L, Zhang Q, Yan H, Liu K. Enhanced cell uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through direct chemisorption of FITC-Tat-PEG 600-b-poly(glycerol monoacrylate). *Int J Pharm*. 2012;
137. Rao, Kavitha S.;Raddy, Maram K.; Horning, Jayme L.; Labhasetwar V. TAT-conjugated nanoparticles for the CNS delivery of anti-HIV drugs. *HHS Public Access*. 2009;29(33):4429–38.
138. Douziech-Eyrolles L, Marchais H, Hervé K, Munnier E, Soucé M, Linassier C, et al. Nanovectors for anticancer agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(4):541–50.
139. Estelrich J, Escribano E, Queralt J, Busquets MA. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):8070–101.
140. Freeman MW, Arrott A, Watson JHL. Magnetism in Medicine. *J Appl Phys*. 1960;8(3):413.
141. Voltairas PA, Fotiadis DI, Michalis LK. Hydrodynamics of magnetic drug targeting. *J Biomech*. 2002;35(6):813–21.
142. Ruuge EK, Rusetski AN. Magnetic fluids as drug carriers: Targeted transport of drugs by a magnetic field. *J Magn Magn Mater*. 1993;122(1–3):335–9.
143. Grief AD, Richardson G. Mathematical modelling of magnetically targeted drug delivery. *J Magn Magn Mater*. 2005;293(1):455–63.
144. Estelrich J, Antònia Busquets M. Iron oxide nanoparticles in photothermal therapy. *Molecules*. 2018;23(7).
145. Kost J, Wolfrum J, Langer R. Magnetically enhanced insulin release in diabetic rats. *J Biomed Mater Res*. 1987;21(12):1367–73.
146. Jafari S, Soleimani M, Salehi R. Nanotechnology-based combinational drug delivery systems for breast cancer treatment. *Int J Polym Mater Polym Biomater*. 2019;68(14):859–69.

147. Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications. *Int J Pharm.* 2014;461(1–2):351–66.
148. Zhang J, Ma P. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Bone.* 2008;23(1):1–7.
149. Ziarani GM, Malmir M, Lashgari N, Badiei A. The role of hollow magnetic nanoparticles in drug delivery. 2019;25094–106.
150. Lou XW, Archer LA, Yang Z. Hollow micro-/nanostructures: Synthesis and applications. *Adv Mater.* 2008;20(21):3987–4019.
151. Fan HJ, Gösele U, Zacharias M. Formation of nanotubes and hollow nanoparticles based on kirkendall and diffusion processes: A review. *Small.* 2007;3(10):1660–71.
152. He Q, Wu Z, Huang C. Hollow magnetic nanoparticles: Synthesis and applications in biomedicine. *J Nanosci Nanotechnol.* 2012;12(4):2943–54.
153. Xu S, Yin B, Guo J, Wang C. Biocompatible hollow magnetic supraparticles: Ultrafast microwave-assisted synthesis, casein-micelle-mediated cavity formation and controlled drug delivery. *J Mater Chem B.* 2013;1(33):4079–87.
154. Pratsinis SE, Vemury S. Particle formation in gases: A review. *Powder Technol.* 1996;88(3):267–73.
155. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials.* 2010;31(13):3657–66.
156. Roser M, Fischer D, Kissel T. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: Effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998;46(3):255–63.
157. Fang C, Shi B, Pei YY, Hong MH, Wu J, Chen HZ. In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles: Effect of MePEG molecular weight and particle size. *Eur J Pharm Sci.* 2006;27(1):27–36.
158. Shubayev VI, Pisanic TR, Jin S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(6):467–77.
159. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles : Theory to Practice. 2001;53(2):283–318.
160. Majumbar S, Zoghbi SS, Gore JC. Pharmacokinetics of Superparamagnetic Iron-Oxide MR Contrast agents in the Rat. 1990. p. 7.
161. Varallyay P, Nesbit G, Muldoon LL, Nixon RR, Delashaw J, Cohen JI, et al. Comparison of two superparamagnetic viral-sized iron oxide particles ferumoxides and ferumoxtran-10 with a gadolinium chelate in imaging intracranial tumors. *Am J Neuroradiol.* 2002;23(4):510–9.

162. Bourrinet P, Bengele HH, Bonnemain B, Dencausse A, Idee JM, Jacobs PM, et al. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Invest Radiol.* 2006;41(3):313–24.
163. Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul.* 1996;13(3):245–55.
164. Iannone A, Magin RL, Walczak T, Tomasi A. Blood Clearance of Dextran Magnetite Particles Determined. 1991;442:435–42.